

ADRIA DO PRADO BARROS

Avaliação da eficácia *in vivo* da L-arginina na elasticidade da pele.

BRASÍLIA, 2012

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ADRIA DO PRADO BARROS

Avaliação da eficácia *in vivo* da L-arginina na elasticidade da pele.

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin

**Brasília
2012**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ADRIA DO PRADO BARROS

Avaliação da eficácia *in vivo* da L-arginina na elasticidade da pele.

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília.**

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (Presidente)
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca
Universidade de São Paulo**

**Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Camila Fracalossi Redigueri (Membro Suplente)
ANVISA**

***Aos meus amados pais, Francisco e Julinda,
e ao meu irmão, Adson***

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças e me capacitar para seguir em frente.

Aos meus queridos pais Francisco e Julinda por terem me acalmado nos momentos de angústias e me apoiado sempre. Pelas infinitas orações e amor incondicional.

Ao meu irmão Adson pela compreensão e preocupação em todos momentos da minha vida.

A toda minha família e amigos que sempre me deram suporte e me apoiaram nessa etapa.

À minha orientadora, Dra. Maria de Fátima Borin, que me acompanha desde a graduação, pela amizade, confiança, paciência, compreensão e ensinamentos científicos e de vida.

Aos Professores Anamélia Lorenzetti Bocca, Rivadávio Fernandes Batista de Amorim, Eliete Neves da Silva Guerra e Nilce Santos de Melo pelo apoio e ajuda na realização da pesquisa.

Às farmacêuticas e amigas Nathália Lobão Barroso de Souza e Marina Miranda Rocha de Oliveira, que me ofereceram uma ajuda preciosa durante toda a realização do projeto. Por toda dedicação, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus amigos do laboratório Ana Carolina Fernandes Araujo, Ângela Mendonça, Ana Camila Oliveira Souza, Ênio Mangabeira Chaves, Márcio Sousa Jêronimo e Pedro Góes Mesquita que me incentivaram e me deram forças em diferentes momentos da pesquisa.

A todos do Laboratório de Farmacologia Molecular, em especial ao professor Francisco de Assis Rocha Neves.

A todos do Laboratório de Cirurgia Experimental, da Faculdade de Medicina.

Ao Laboratório de Histopatologia Bucal, em especial à técnica de laboratório Maria da Glória da Silva por toda ajuda e dedicação para a realização de algumas etapas da pesquisa.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial à Professora Dra. Maria José Vieira Fonseca e à doutoranda Rebeca Oliveira de Souza, pelo apoio e ensinamentos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), à Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade de Brasília pelo apoio financeiro a este projeto e pelas bolsas de mestrado.

Aos que não mencionei aqui, mas que me ajudaram de alguma forma durante as diferentes fases desse projeto.

Muito obrigada.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado,
mas faz parte do processo da busca.”

Paulo Freire

RESUMO

O processo de envelhecimento da pele em humanos é um mecanismo bastante complexo, uma vez que além dos efeitos do envelhecimento cronológico a pele também sofre os efeitos do envelhecimento extrínseco. De modo geral, as modificações ocorrem parcialmente como resultado do acúmulo de danos endógenos resultados da formação contínua de espécies reativas de oxigênio. O estrato córneo permanece relativamente inalterado, mas a epiderme e a derme sofrem um achatamento das junções dermo-epidérmicas, uma redução na capacidade proliferativa e biossintética das células, que resulta em uma diminuição da produção de matriz dérmica, um aumento da expressão das metaloproteinases de matriz (MMP), e um conseqüente adelgaçamento do tecido cutâneo, redução da vascularização, redução da expressão de colágeno tipo I e desaparecimento progressivo do tecido elástico na derme papilar. A L-arginina é o substrato da síntese de óxido nítrico e está envolvida na angiogênese e na proliferação celular. Ao mesmo tempo, a L-arginina é precursora indireta da síntese de colágeno, por ser utilizada na síntese de prolina, componente da fibra de pró-colágeno. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes concentrações da L-arginina na elasticidade da pele de camundongos, através da avaliação da força tênsil suportada pela pele, avaliação histológica e imuno-histoquímica, determinação do grau de lipofilia da L-arginina, ensaio de retenção, penetração e permeação cutânea e da atividade proteolítica das MMPs por eletroforese em gel de poliácridamida, com o intuito de avaliar a possibilidade de usá-la como ativo cosmético em produtos anti-envelhecimento. Os resultados obtidos sugerem que a aplicação de L-arginina melhora a resistência da pele à força de tração para camundongos do grupo de fêmeas idosas e promove a formação de uma maior quantidade de fibras colágenas e elásticas na pele quando aplicada na concentração de 15%. Nos grupos de animais idosos, machos ou fêmeas, tratados com L-arginina foi observada também uma diminuição da atividade proteolítica das MMPs. Estudos posteriores devem ser realizados para melhor elucidar o mecanismo da melhora da elasticidade da pele pela aplicação de L-arginina.

Palavras-chave: envelhecimento; fibras colágenas e elásticas; L-arginina; metaloproteinase.

ABSTRACT

Skin, just like any other organ of the human body, suffers the effects of chronological aging and, unlike the others, also suffers the effects of extrinsic aging. The process of aging skin in humans is a quite complex mechanism that begins to be understood. Overall, the changes occur partly as a result of the accumulation of endogenous injuries resulting from the continuing formation of reactive oxygen species generated by cellular oxidative metabolism. The stratum corneum remains relatively unchanged, but the epidermis and dermis undergo a flattening of the dermal-epidermal junction, reduction in the proliferative and biosynthetic ability of cells, which results in a decrease in the dermal matrix production, increased expression of matrix metalloproteinases (MMP), with a consequent skin thinning, reduced vascularization, decreased collagen type I expression and progressive decrease of elastic tissue in the papillar dermis. The loss of elastic fibers integrity is associated with progressive reduction of skin elasticity. L-arginine is the substrate of nitric oxide synthesis and is thus indirectly involved in many important regulatory mechanisms, such as angiogenesis and cell proliferation. At the same time, L-arginine is an indirect precursor of collagen synthesis because of its use in proline synthesis, a component of procollagen. The aim of this study was to evaluate the influence of different concentrations of L-arginine in mice skin elasticity in order to evaluate the possibility of using it as a cosmetic ingredient in anti-aging products. For that, the tensile strength supported by the skin, histological and immunohistochemical analysis, the L-arginine lipophilicity, retention, penetration and permeation tests and proteolytic activity of MMPs in polyacrylamide gel were evaluated. The results suggested that the application of L-arginine improves the skin resistance to traction force in female elder mice and L-arginine promotes the formation of a higher amount of collagen and elastic fibers in the skin when applied at a concentration of 15%. In groups of aged animals, males or females, treated with L-arginine it was also observed a decrease in proteolytic activity of MMPs. Further studies should be performed to further elucidate the mechanism of the skin elasticity improvement by application of L-arginine.

Keywords: skin aging, collagen and elastic fibers, L-arginine; metalloproteinase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes celulares e extracelulares da pele jovem.....	1
Figura 2. Pele envelhecida intrinsecamente e extrinsecamente.	4
Figura 3. Molécula de <i>L</i> -arginina.	15
Figura 4. Síntese de óxido nítrico a partir da <i>L</i> -arginina	16
Figura 5. Esquema da absorção intestinal da arginina.	16
Figura 6. Modelo esquemático das vias de penetração cutânea.	19
Figura 7. Fases da penetração cutânea.	20
Figura 8. Preparação da pele de orelha suína.	26
Figura 9. Imagem esquemática da célula de difusão de Franz..	28
Figura 10. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos machos idosos.	31
Figura 11. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos machos adultos.	32
Figura 12. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos machos jovens.	32
Figura 13. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos fêmeas idosas.	33
Figura 14. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos fêmeas adultas.	34
Figura 15. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos fêmeas jovens.	34
Figura 16. Análise de fibras colágenas na pele de camundongos machos idosos.	37
Figura 17. Análise de fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas idosas.	38
Figura 18. Análise de fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas adultas.	38
Figura 19. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos machos idosos.	39
Figura 20. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos machos adultos.	40
Figura 21. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos machos jovens.	40

Figura 22. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas idosas.	41
Figura 23. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas adultas.	42
Figura 24. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas jovens.	42
Figura 25. Análise de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas idosas.	43
Figura 26. Análise de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas jovens.	44
Figura 27. Comparação entre a quantidade de fibras elásticas na pele dos camundongos machos e fêmeas dos grupos controle.	44
Figura 28. Análise de iNOS por coloração imuno-histoquímica na pele de camundongos machos.	46
Figura 29. Análise da pele dos camundongos fêmeas por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS.	48
Figura 30. Análise da pele dos camundongos fêmeas por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS.	48
Figura 31. Análise da pele de camundongos fêmeas por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS.	49
Figura 32. Avaliação da retenção cutânea de L-arginina.	50
Figura 33. Avaliação da penetração da L-arginina na pele (epiderme e derme).	51
Figura 34. Avaliação da permeação cutânea da L-arginina.	52
Figura 35. Avaliação da retenção, penetração e permeação cutânea da dispersão de L-arginina, na concentração de 5%.	53
Figura 36. Avaliação da retenção, penetração e permeação cutânea da dispersão de L-arginina, na concentração de 10%.	53
Figura 37. Avaliação da retenção, penetração e permeação cutânea da dispersão de L-arginina, na concentração de 15%.	54
Figura 38. Curva padrão para determinação da massa molecular relativa.	55
Figura 39. Avaliação da atividade proteolítica por zimografia da pele de camundongos machos idosos.	58
Figura 40. Avaliação da atividade proteolítica por zimografia da pele de camundongos fêmeas idosas.	58
Figura 41. Modelo de indução redox-dependente de MMP-1 associado à senescência.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação das fibras colágenas na pele de camundongos machos.	36
Tabela 2 - Avaliação das fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas.....	37
Tabela 3 - Avaliação por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS na pele de camundongos machos.....	45
Tabela 4 - Avaliação por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS na pele de camundongos fêmeas.....	47
Tabela 5 - Atividade proteolítica em gel de eletroforese (acrilamida/bisacrilameda 10% e gelatina 1%) da pele de camundongos machos.....	56
Tabela 6 - Atividade proteolítica em gel de eletroforese (acrilamida/bisacrilameda 10% e gelatina 1%) da pele de camundongos fêmeas.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Ativador de proteína 1
Arg. 10%	Dispersão de <i>L</i> -arginina a 10% em glicerol
Arg. 15%	Dispersão de <i>L</i> -arginina a 15% em glicerol
Arg.5%	Dispersão de <i>L</i> -arginina a 5% em glicerol
BSA	Albumina de soro bovino
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CTRL	Controle
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DAB	Diaminobenzidina 3,3'
EC	Estrato córneo
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
FACITs	Colágenos associados a fibrilas com tripla hélice ininterruptas
Glic.	Glicerol
HCl	Ácido clorídrico
HLE	Elastase leucocitária humana
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LTBPs	Complexo latente de ligação ao TGF-β
MMP	Metaloproteinase de matriz
mRNA	RNA mensageiro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NEM	N-etilmaleimida
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
ORN	Ornitina

PBS	Tampão fosfato salina
PHE	Fenantrolina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
SFB	Soro fetal bovino
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz
TR	Tampão receptor
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
SUMÁRIO	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	1
1.2. COLÁGENO E FIBRAS ELÁSTICAS.	5
1.2.1. Colágeno.....	5
1.2.2. Fibras elásticas.	8
1.3. METALOPROTEINASES.	11
1.4. ARGININA.....	15
1.5. RETENÇÃO, PENETRAÇÃO E PERMEABILIDADE CUTÂNEA.....	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVO GERAL.	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	21
3. MATERIAS E MÉTODOS.	21
3.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:.....	22
3.2. PREPARO DAS DISPERSÕES DE L-ARGININA.	23
3.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> DA L-ARGININA NA ELASTICIDADE DA PELE DE CAMUNDONGOS.....	23
3.4. AVALIAÇÃO DA ELASTICIDADE DA PELE.	24
3.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	24

3.6.	DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIPOFILIA DA <i>L</i> -ARGININA - DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA ($K_{O/A}$).....	25
3.7.	ENSAIO DE RETENÇÃO, PENETRAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	26
3.8.	QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDO.....	28
3.9.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE METALOPROTEINASE POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	28
3.10.	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS.....	29
3.11.	DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY.....	30
3.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4.	RESULTADOS	31
4.1.	AVALIAÇÃO DA ELASTICIDADE DA PELE <i>IN VIVO</i>	31
4.2.	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	35
4.2.1.	Avaliação das fibras de colágeno	35
4.2.2.	Avaliação das fibras elásticas	39
4.2.3.	Análise por imuno-histoquímica para detecção de iNOS	45
4.3.	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO-ÁGUA DA <i>L</i> -ARGININA.....	49
4.4.	AVALIAÇÃO DE RETENÇÃO, PENETRAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA.....	50
4.5.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA METALOPROTEINASE.....	54
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÕES	75
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXO I	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.

A pele, considerada um dos maiores órgãos do corpo humano, é composta por uma camada dupla que envolve toda a superfície corporal: a epiderme, camada avascularizada e constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, e a derme, camada subjacente à epiderme e constituída de tecido conjuntivo, rica em fibroblastos e, conseqüentemente, em fibras elásticas, colágenas e glicosaminoglicanos (figura 1). Tem como principal função delimitar a área do corpo, comportando-se, dessa forma, como uma barreira mediadora entre o organismo e o ambiente (1,2). Além de revestir a superfície corporal, protege contra desidratação, infecções e lesões provocadas por agressões físicas, mecânicas e químicas (3).

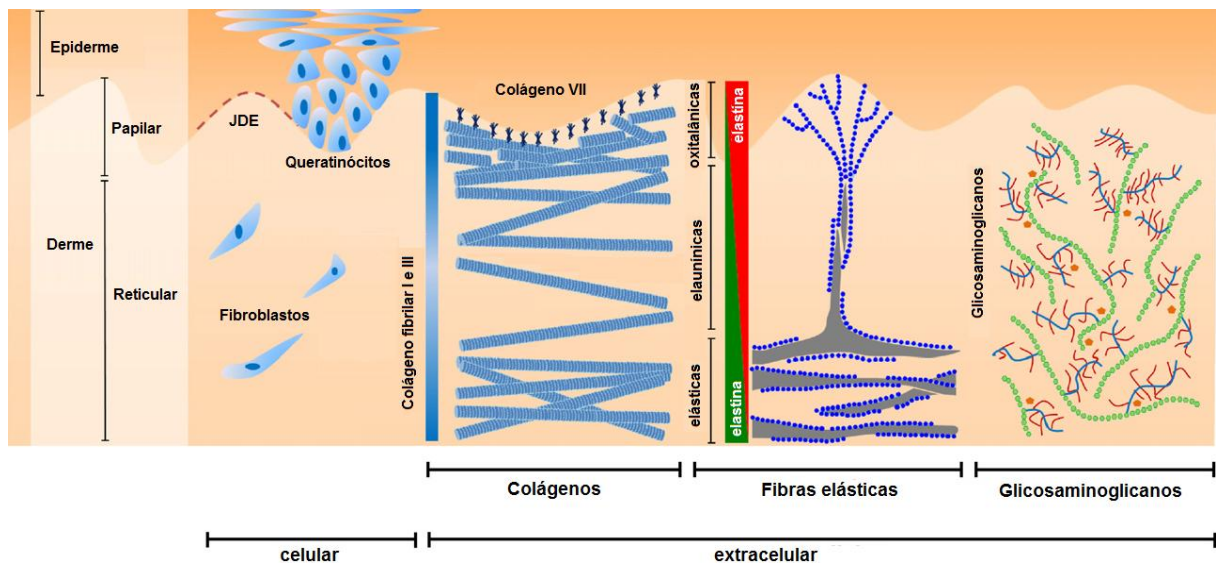


Figura 1. Componentes celulares e extracelulares da pele jovem.

Epiderme avascularizada, rica em queratinócitos que são fixados à membrana basal por junções dermo-epidérmicas (DEJ). Derme vascularizada, com fibroblastos esparsos, os quais são predominantemente responsáveis pela síntese de colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos, componentes da matriz extracelular (4).

Assim como todos os outros órgãos, a pele também sofre envelhecimento cronológico e, diferente dos demais, ela está em contato direto com o meio ambiente e, portanto, ainda sofre envelhecimento como consequência das agressões ambientais (5-7). Esse processo de envelhecimento da pele em humanos é um mecanismo complexo e frequentemente induzido por fatores intrínsecos, em grande

parte determinados geneticamente, e por fatores extrínsecos, causados por exposição ambiental, principalmente radiação ultravioleta, tabagismo, consumo excessivo de álcool e má nutrição. Desses fatores externos, a exposição ao sol é considerado o mais deletério para a pele (4, 8-9).

No processo de envelhecimento da pele, os principais componentes envolvidos são o colágeno, a rede de fibras elásticas e os glicosaminoglicanos (figura 2). O colágeno, componente extracelular mais abundante da pele, fornece propriedades de tração à derme. A rede de fibras elásticas fornece elasticidade à pele e é responsável pela composição de cerca de 2 a 4% da matriz extracelular na pele foto-protegida. Os glicosaminoglicanos desempenham um importante papel na hidratação da pele e na sinalização biológica, e correspondem a apenas 0,1 a 0,3% do peso seco da pele. A extrema longevidade dessas biomoléculas, quando comparadas com as proteínas intracelulares, expõe as mesmas a lesões cumulativas, o que causa impactos sobre as propriedades biomecânicas e sobre os mediadores homeostáticos do tecido (4, 8).

No envelhecimento extrínseco, ou foto-envelhecimento, têm sido descritas mudanças nesses três componentes. Em contraste com o teor de glicosaminoglicanos e da rede de fibras elásticas, as fibras de colágeno, incluindo colágeno tipo I e decorina, estão reduzidas. Na pele severamente fotoenvelhecida, além da perda de colágeno tipo I e III em toda a derme, há também a perda de colágeno VII nas junções dermo-epidérmicas. Essa redução na produção de fibras colágenas tem sido acompanhada da degeneração da rede de colágenos ao redor da área envelhecida e da quebra das fibras elásticas. Além disso, esse acúmulo de colágeno parcialmente degradado tem efeito negativo sobre os fibroblastos (4,8,10)

Assim como o envelhecimento cronológico, o envelhecimento extrínseco também é um processo cumulativo. No entanto, enquanto o envelhecimento cronológico depende somente do tempo, o foto-envelhecimento depende do grau de exposição ao sol e da pigmentação da pele. Estima-se que os efeitos da luz solar representem até 90% do envelhecimento visível da pele, particularmente nas peles sem proteção natural, associada aos níveis de melanócitos (5,11).

A pele fotoenvelhecida apresenta várias manifestações clínicas, como aspereza, rugas, descoloração amarelada, telangiectasia, pigmentação irregular,

uma série de neoplasias benignas ou potencialmente malignas, perda na elasticidade, aumento na fragilidade e áreas de púrpura. Apresenta, ainda, fibras colágenas espessas, fragmentadas e mais solúveis e fibras elásticas também fragmentadas com uma progressiva calcificação (9,7,12).

Muito ainda deve ser estudado para elucidar o mecanismo pelo qual a radiação UV induz vários efeitos adversos à saúde, mas já é conhecido que o foto-envelhecimento, a fotocarcinogênese e a foto-imunossupressão são sequelas da exposição à radiação UV, particularmente na faixa UVA (320 a 400 nm). Outra característica importante é que no envelhecimento extrínseco o encurtamento dos telômeros, estruturas especializadas encontradas nas extremidades dos cromossomos dos eucariontes e que têm papel central no envelhecimento intrínseco, não funciona como um “relógio do envelhecimento” (9).

No envelhecimento intrínseco, ou cronológico, as alterações são semelhantes às que ocorrem na maioria dos órgãos internos. As modificações ocorrem parcialmente como resultado do acúmulo de lesões endógenas devido à formação contínua de espécies reativas de oxigênio, que são geradas pelo metabolismo oxidativo celular. O estrato córneo permanece relativamente inalterado, mas a epiderme e a derme sofrem um achatamento das junções dermo-epidérmicas, uma redução na capacidade proliferativa e biossintética das células cutâneas, principalmente de fibroblastos, o que resulta em uma diminuição da produção de matriz dérmica, um aumento da expressão das colagenases, em especial das metaloproteinases de matriz (MMP), com um consequente adelgaçamento do tecido cutâneo, redução da vascularização, redução da expressão de colágeno tipo I e desaparecimento progressivo do tecido elástico na derme papilar. Em relação ao colágeno, além da redução do conteúdo, as fibras existentes ficam mais densas e localizadas aleatoriamente (8,13-14). Na derme reticular, tecido conjuntivo denso, a rede elástica fica espessada, desorganizada e fragmentada. Essa perda da integridade das fibras elásticas está associada à perda progressiva da elasticidade (12,14).

As diferenças histológicas entre o envelhecimento intrínseco e o foto-envelhecimento é que no primeiro geralmente acontece a perda total da matriz extracelular e no segundo ocorrem aumentos seletivos, como de elastina. No foto-

envelhecimento, a resposta inicial das fibras elásticas é a sua hiperplasia. A elastose solar dérmica, emaranhado de fibras elásticas que formam uma massa amorfa, é a principal característica do foto-envelhecimento, figura 2 (12,14).

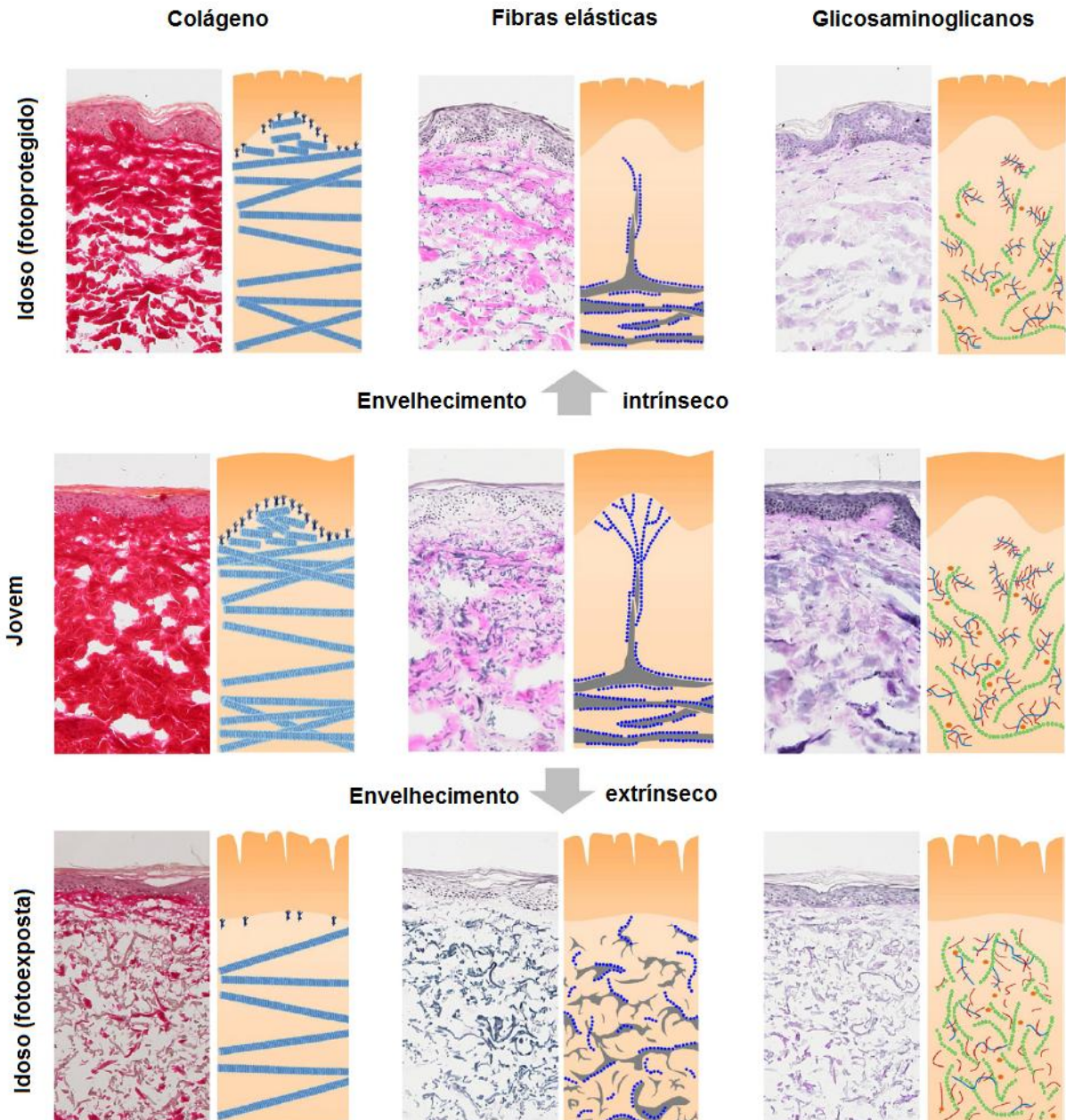


Figura 2. Pele envelhecida intrinsecamente e extrinsecamente.

Colágeno, fibras elásticas e glicosaminoglicanos (visualizados com coloração de Picro Sírius vermelho, método de coloração de Miller e ácido periódico, respectivamente) apresentaram diferenças significativas entre a pele envelhecida fotoprotegida e fotoexposta (4)

Essas modificações colágeno-elásticas explicam as adaptações bioquímicas e biomecânicas da pele com a idade, uma vez que a espessura e as propriedades viscoelásticas da pele não dependem somente da quantidade de material presente na derme, mas também da sua organização estrutural. Dessa forma, para estudar o envelhecimento da pele é necessário compreender as alterações estruturais e funcionais que ocorrem com o avançar da idade e distinguir as mudanças resultantes de um processo intrínseco daquelas que são efeitos de processos patológicos ou agressões ambientais externas. Além disso, deve-se levar em consideração que a taxa de envelhecimento é significativamente diferente nas diferentes populações, bem como nos diferentes sítios anatômicos de uma única pessoa, variando características da pele, como espessura total, espessura relativa da derme e epiderme, dentre outras, independentemente da idade (8,11,13).

1.2. COLÁGENO E FIBRAS ELÁSTICAS.

1.2.1. Colágeno.

O colágeno é a proteína mais abundante da derme, constituindo cerca de 70 a 80% de seu peso. É o principal componente estrutural da derme, responsável pela força e suporte da pele humana (1,7,9). Sua síntese é feita pelos fibroblastos em dois estágios, envolvendo eventos intracelulares, que dão origem ao pró-colágeno, e extracelulares, que dão origem ao tropocolágeno, unidade básica do colágeno. O colágeno maduro, por sua vez, forma fibrilas que são estabilizadas por ligações cruzadas; essas fibrilas são responsáveis, em grande parte, pela força e resistência da pele (1,15-16).

Atualmente são conhecidos cerca de vinte e oito tipos de colágeno, juntamente com um grande número de proteínas ligadas ao colágeno, como acetilcolinesterase, adiponectina e outras. Os colágenos são classificados por função e domínios homólogos em: colágenos formadores de fibrilas (colágenos tipos I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII), que são a principal fonte de resistência à tração no tecido animal; colágenos associados a fibrilas com tripla hélice ininterruptas-FACITs

(colágenos tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII e XXVI); colágenos formadores de rede (tipos IV, VI, VIII e X); colágenos transmembrana (tipos XIII, XVII e XXV); colágenos produtores de endostatina (tipos XV e XVIII); fibrilas de ancoragem (VII) e colágeno formador de filamento. Os colágenos fibrilares formam fibras e fibrilas altamente organizadas que dão origem a tecidos específicos e fornecem suporte estrutural para o corpo (15,17-18).

O colágeno tipo I é predominante na derme e é considerado o mais importante, por ser o mais abundante e amplamente distribuído no organismo. Pode ser encontrado nos ossos, tendões, pele, ligamentos, artérias, útero e córnea. O colágeno tipo III, denominado reticulina, está presente em grande quantidade na derme; os colágenos tipo IV e VII estão presentes principalmente na membrana basal; o tipo V apresenta estrutura fibrilar e está presente de forma generalizada nos ossos, cartilagens, córnea e placenta, e o tipo VI compõe uma fina rede dispersa nos interstícios das grandes fibras de colágeno e pode ser encontrado nos ossos, cartilagens, córnea e derme (1,18).

O colágeno é sintetizado por fibroblastos e outras células, como osteoblastos e odontoblastos, e catabolizado por um grupo de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases de matriz (MMP), produzidas por fibroblastos e outros tipos de células, como queratinócitos, células endoteliais e células inflamatórias. Estas enzimas, atuando em conjunto, podem levar à degradação total de colágeno, mas existe um fator que influencia esse catabolismo, a presença de inibidores fisiológicos das MMPs (TIMPs). No envelhecimento cronológico, o que se observa é um aumento dos níveis de MMPs com a idade, uma menor taxa da síntese de colágeno e redução dos TIMPs, o que explica o aspecto flácido da pele envelhecida (19-20).

Com o aumento da idade o conteúdo das fibras de colágeno da pele diminui e muitas dessas fibras associadas à infância tornam-se mais densas e dispostas aleatoriamente (8,21). Geralmente, essas lesões causadas à derme são determinantes nas alterações que ocorrem no envelhecimento cronológico e no foto-envelhecimento e, apesar de todos os componentes da pele sofrerem modificações, as mudanças qualitativas e quantitativas em relação ao colágeno explicam muitas das manifestações clínicas do envelhecimento, tais como rugas, flacidez, rachaduras, entre outras (10,15,19).

A proporção de colágeno na derme reflete um equilíbrio metabólico entre os processos de síntese e degradação (19,22). Com o aumento da idade a taxa biossintética de colágeno diminui, sendo menor na pele de indivíduos idosos do que no tecido fetal ou durante os primeiros anos de vida. A proporção dos tipos de colágeno também se altera com a idade e, em geral, o conteúdo de colágeno por unidade de área da superfície da pele diminui aproximadamente 1% ao ano. Os níveis de colágeno degradado são quatro vezes maiores na pele de idosos do que na pele de jovens. Na pele jovem, 80% do colágeno total da pele é tipo I e aproximadamente 15% tipo III, na pele mais velha a proporção de colágeno tipo III tende a aumentar devido à redução apreciável de colágeno tipo I (8-9,23).

Na pele submetida à radiação ultravioleta, os níveis de colágeno tipo I são reduzidos em 59% e, apesar do colágeno tipo I ser o mais abundante na pele, outros tipos de colágeno também sofrem os efeitos do envelhecimento. O colágeno tipo IV, constituinte das junções dermo-epidérmicas e fundamental na estabilidade mecânica da pele, não apresenta nenhuma diferença significativa em relação a seus níveis quando comparada a pele fotoenvelhecida à pele envelhecida naturalmente; no entanto, níveis significativamente mais baixos de colágeno tipo IV foram identificados na base das rugas em comparação com os flancos das mesmas. Essa perda de colágeno tipo IV pode afetar a estabilidade mecânica das junções dermo-epidérmicas e contribuir para a formação de rugas. Outro tipo de colágeno afetado é o tipo VII, principal componente das fibrilas de ancoragem, que ligam a membrana basal à derme papilar. Em um estudo realizado por Craven e colaboradores, em 1997, foi observado um número significativamente menor de fibrilas em pacientes cronicamente expostos ao sol em comparação com os controles normais. Outro estudo mais recente mostrou que essa perda de colágeno tipo VII é mais proeminente na base da ruga (24,25). Baseada nesses resultados foi criada a teoria de que as rugas podem resultar de um elo enfraquecido entre a derme e a epiderme devido à degradação de fibrilas de ancoragem (9).

O conhecimento do papel do colágeno no processo do envelhecimento contribuiu para o uso de colágeno bovino como agente de preenchimento, na substituição do colágeno perdido com a idade. Apesar do pouco conhecimento sobre

a patogênese das rugas já foi demonstrado que as alterações no colágeno são determinantes no envelhecimento (9).

1.2.2. Fibras elásticas.

As fibras elásticas são estruturas altamente insolúveis, compostas por elastina reticulada, microfibrilas ricas em fibrilina, microfibrilas associadas a glicoproteínas, fibulina e fator de crescimento transformador latente ligado à proteína (LTBPs). Estas fibras são importantes componentes da matriz extracelular de tecidos dinâmicos, como vasos sanguíneos e pulmões. Sua distribuição nos tecidos, combinada com o baixo módulo de elasticidade e a alta resiliência da elastina, permite às fibras elásticas complementarem a força de tração do colágeno fibrilar. As fibras elásticas são capazes de se deformar, de armazenar energia, sob cargas fisiológicas normais, e de usar essa energia para voltar o tecido para o estado de repouso. A manutenção dessas propriedades mecânicas é fundamental para a função dos tecidos dinâmicos dentro do sistema cardio-respiratório, e tem sido sugerido que a falha das fibras elásticas relacionada à idade pode ser responsável por um limite aparente de 100 a 120 anos na expectativa de vida humana (4,25).

Em geral, as proteínas da matriz extracelular apresentam uma longevidade notável, em particular as do sistema de fibras elásticas. Em contraste com muitas proteínas intracelulares, em que a meia-vida é mensurada em horas ou, no máximo, em dias, muitas proteínas da matriz extracelular têm a meia-vida medida em anos. Os colágenos tipo I e II e a cartilagem, por exemplo, têm meia-vida estimada de 15 a 95 anos, enquanto que a idade das fibras elásticas é equivalente a ou muitas vezes maior que a idade do indivíduo (4). Além disso, a síntese e deposição de elastina é predominantemente limitada ao desenvolvimento fetal e pós-natal por um mecanismo pós-transcricional que medeia a decomposição do mRNA de elastina em adultos. Após a idade de 40-50 anos, por exemplo, a expressão gênica de elastina é reduzida e há desaparecimento progressivo do tecido elástico na derme. A reduzida capacidade das células envelhecidas em ressintetizar essas fibras se apresenta clinicamente na perda da capacidade de recolhimento da pele, característica comum da pele envelhecida. As proteínas da rede de fibras elásticas precisam funcionar por

muitos anos e, durante esse período, acontecem muitas lesões e modificações dependentes do tempo (4,8).

Na pele, o sistema de fibras elásticas é altamente ordenado e fundamental na mediação da resistência do tecido. Este corresponde a cerca de 2 a 4% do peso total da pele e é responsável por suas propriedades retráteis. Na derme reticular, as fibras elásticas de grande diâmetro encontram-se paralelas à superfície da pele. Estão conectadas às fibras elaulínicas, de menor diâmetro, na derme papilar e, eventualmente, às fibras oxitalânicas, que conectam a derme papilar e a epiderme através das junções dermo-epidérmicas. A proporção de elastina com relação à fibrilina diminui com a proximidade da epiderme, e as fibras oxitalânicas parecem ser somente microfibrilares (4,8,26-27).

O número de doenças cutâneas revela o importante papel estrutural desempenhado pelo sistema de fibras elásticas. Muitas dessas doenças são desordens hereditárias em um único gene, nas quais as estruturas elásticas são seletivamente destruídas. Indivíduos afetados por essas doenças apresentam sintomas de envelhecimento cutâneo e perda da resistência da pele, como visto na *cútis laxa*, uma doença causada por um defeito específico na elastina ou na microfibrila da rede de fibras elásticas. Outra doença causada por mutações em componentes das fibras elásticas, especificamente mutações na fibrilina 1, é a Síndrome de Marfan, que está associada a defeitos oculares (subluxação do cristalino), cardiovasculares e esqueléticos. Mutações na fibrilina 2 causam *aracnodactilia contratural congênita*, com sobreposição de sintomas esqueléticos e oculares (27-28).

A complexidade do sistema de fibras elásticas, devido a seus vários componentes, e o fato das fibras serem altamente insolúveis dificultam a medida direta da sua taxa de biossíntese. Entretanto, técnicas de biologia molecular permitem medir os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de elastina, o que serve como indicativo da taxa de biossíntese na pele. Em 1988, Fazio examinou os níveis de mRNA nos fibroblastos a partir da pele de indivíduos de várias idades, na faixa de 3 a 61 anos de idade, e os dados mostraram que a taxa de biossíntese de elastina permaneceu relativamente estável entre a terceira e quarta década de vida, após isso declinava rapidamente. Os idosos têm uma menor capacidade de substituir as

fibras elásticas perdidas pelo processo natural de degradação. Isso ocorre ao mesmo tempo em que é perdida a capacidade de restaurar o quadro de fibras colágenas e que ocorre o declínio dos níveis de glicosaminoglicanos, o que resulta em uma hidratação reduzida e, conseqüentemente, uma atrofia dérmica (28).

O processo de envelhecimento tem efeitos profundos sobre a estrutura e função do sistema de fibras elásticas. A pele humana acumula tanto as lesões provenientes dos processos metabólicos normais, quanto as resultantes das interações com os fatores ambientais. Apesar desses dois processos, envelhecimento intrínseco e envelhecimento extrínseco, serem independentes, e envolverem mecanismos moleculares, bioquímicos e biológicos diferentes, ambos resultam em grandes alterações nas fibras elásticas. A pele danificada pela radiação ultravioleta é caracterizada por um acúmulo de material elastótico, enquanto as áreas protegidas do sol apresentam um número diminuído de fibras elásticas. A característica comum associada à idade em ambos os processos é a perda das funções normais das fibras elásticas, o que pode explicar algumas das manifestações do envelhecimento cutâneo, como rugas, flacidez, perda da capacidade de resistência e elasticidade (25,29).

Na pele intrinsecamente envelhecida, a aparência lisa e as rugas finas, associadas com uma fragmentação gradual da rede de fibras elásticas, contrastam com a pele fotoenvelhecida, a qual é levemente áspera, com rugas profundas e histologicamente caracterizada pela perda de microfibrilas de fibrilina e fibulina a partir da derme papilar. Na pele severamente fotoenvelhecida ocorre, ainda, uma deposição altamente desordenada de material de fibras elásticas distribuídas ao longo da derme (26). Esse material desorganizado de fibras elásticas, que consiste basicamente em estruturas de elastina espessas com aspecto granular amorfo, é conhecido como elastose dérmica. A exposição à luz ultravioleta induz esse espessamento e enrolamento das fibras elásticas na derme papilar. Quando a exposição aos raios UV é crônica, essas alterações também ocorrem da derme reticular. Dessa forma, a intensidade do acúmulo de fibras elásticas depende do grau de exposição ao sol. A etiologia básica das mudanças relacionadas à idade na elastina não é bem compreendida como as mudanças relacionadas ao colágeno,

mas acredita-se que as metaloproteinases desempenhem um papel nesse processo, uma vez que a MMP-2 degrada elastina (9,26,29).

Nos estudos realizados por Seite e colaboradores, em 2006, foi observado que a radiação UVA, principalmente no intervalo do comprimento de onda de 340 a 400 nm, induziu uma deposição de lisozima nas fibras de elastina, e essa associação de lisozima a essas estruturas de elastina correspondem a uma degeneração basofílica induzida por exposição ao sol. A lisozima não tem atividade elastolítica *in situ*, no entanto, a sua ligação à elastina, limita a degradação de elastina pela elastase leucocitária humana (HLE). Além disso, foi observado um efeito inibitório direto da lisozima na HLE. Dessa forma, esses resultados do trabalho de Seite e colaboradores sugerem que a lisozima impede a degradação de elastina por HLE depois da ligação das partes danificadas da rede de elastina e pela interação direta da lisozima-HLE, que reduz a atividade proteolítica da HLE. Esses dados contribuíram para uma melhor compreensão das alterações relacionadas ao sistema de fibras elásticas, tanto no envelhecimento intrínseco quanto no fotoenvelhecimento (29).

Apesar da importância dos mecanismos acelulares associados ao processo de degradação das fibras elásticas relacionados com a idade, a maioria dos estudos de fotoenvelhecimento estão focados na super-regulação e ativação das metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs). Embora a atividade das MMPs seja aumentada na pele exposta à radiação UV, tal como a das MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 e MMP-13, metaloproteinases capazes de degradar componentes das fibras elásticas, sua baixa especificidade com o substrato torna a expressão destas enzimas um instrumento pouco preciso para mediar a precoce e específica degradação de fibrilina-1 e fibulina-5 das junções dermo-epidérmicas da pele fotoenvelhecida. Além disso, a dificuldade de reparar as fibras elásticas danificadas continua sendo um desafio para a biomedicina. A melhor opção ainda é a prevenção das lesões (4,26).

1.3. METALOPROTEINASES.

As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) constituem uma família de endopeptidases zinco-dependentes, com atividade hidrolítica de amplo espectro para as proteínas extracelulares. São produzidas por vários tipos de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos e células inflamatórias, como, por exemplo, os neutrófilos. São sintetizadas numa forma latente e secretadas como pró-MMPs, inativas. A ativação é acompanhada por proteases de clivagem, do plasma ou tecidos, das interações cisteína-zinco incluídas no pró-peptídeo N-terminal destas enzimas. A ativação da maioria das MMPs ocorre fora das células e a maioria das MMPs podem ser ativadas por outras MMPs ou por proteases de serina. Outros grupos de MMPs não são secretados, permanecem ligadas às superfícies celulares (30-31).

A atividade das MMPs pode ser regulada em vários níveis moleculares, incluindo a transcrição, estabilidade do mRNA, a eficiência da translação, compartimentalização da enzima, ativação proteolítica do zimogênio ou inibição da forma ativa. Os inibidores naturais mais importantes são os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As TIMPs são proteínas secretadas, capazes de formar complexos com as MMPs individuais, que têm um papel central na regulação, tanto da atividade funcional quanto da ativação individual das MMPs. Acredita-se que o equilíbrio entre as MMPs ativadas e os TIMPs determine a atividade as MMPs e a proteólise *in vivo* (30,32).

As MMPs pertencem a um grupo de 25 membros, dos quais 24 são encontradas em mamíferos. Acredita-se que quatro em particular sejam importantes na degradação da matriz da pele. As ações combinadas da colagenase (MMP-1, 57 kDa), gelatinase A (MMP-2, 72 kDa), gelatinase B (MMP-9, 92 KDa) e da estromelina 1 (MMP-3, 57 kDa), são capazes de degradar os colágenos da pele e da rede elástica. As colagenases (MMP-1) são as únicas proteases de mamíferos capazes de hidrolisar fibras colágenas intactas; clivam o colágeno em locais únicos, gerando fragmentos de 75 a 25 kDa, chamados de gelatina. Uma vez clivado no domínio da tripla hélice, o colágeno desnaturado pode ainda ser clivado pela gelatinase e pela estromelina (MMP-3), dando origem a um único aminoácido ou a oligopeptídeos. Além disso, tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 (gelatinases A e B, respectivamente) têm capacidade de degradar a rede de fibras elásticas, sendo que

a MMP-9 apresenta maior atividade elastolítica e de degradação de fibrilina, enquanto que a MMP-2 apresenta maior especificidade para colágeno III e é capaz de degradar componentes da junção dermo-epidérmica (8,16,33).

As MMPs estão envolvidas em vários eventos proteolíticos, em circunstâncias fisiológicas e patológicas, incluindo embriogênese, reabsorção óssea, cicatrização de feridas, inflamação, angiogênese e câncer. As funções das MMPs incluem a liberação de fatores de crescimento a partir da membrana celular ou membrana extracelular, clivagem dos receptores do fator de crescimento a partir das células superficiais, desprendimento das células de adesão, e ativação de outras MMPs, entre outras funções não catabólicas (16,31).

Durante o envelhecimento da pele, o equilíbrio entre a síntese e degradação da matriz extracelular é prejudicado. A colagenólise e a elastólise são atribuídas a uma ação combinada de vários membros das MMPs. Em células senescentes, que se acumulam no interior da pele humana envelhecida, a expressão de MMPs apresenta um padrão alterado, em comparação com as células jovens. Particularmente, a expressão de colagenase-1 (MMP-1) e de estromelisina 1 (MMP-3) são aumentadas nos fibroblastos da pele com o passar do tempo. Clinicamente, a pele fotoenvelhecida é marcada por rugas finas e grossas, despigmentação, aumento da fragilidade e textura áspera. Histologicamente, poucas alterações ocorrem na epiderme, em contraste com o tecido conjuntivo dérmico, que é caracterizado por fibras colágenas danificadas e desorganizadas e maciço acúmulo de material elástico, condição referida como elastose solar. Essas alterações indicam que a luz UV provoca alterações nas proteínas da matriz extracelular e a participação das MMPs é sugerida nesse processo (16,32).

A exposição à radiação UV aumenta a síntese de vários tipos de enzima que degradam colágeno, dentre elas, pelo menos três tipos de MMPs, a colagenase (MMP-1), a estromelisina (MMP-3) e a gelatinase B (MMP-9). Com exceção da MMP-14, a expressão basal do mRNA dos membros das MMPs é extremamente baixa na pele saudável, na pele fotoprotetida e na pele de humanos adultos. As ações combinadas de MMP-1, MMP-3 e MMP-9 têm capacidade de degradar a maioria das proteínas que compõem a matriz extracelular dérmica. Primeiro, a exposição à radiação UV aumenta a quantidade do fator de transcrição c-jun; c-fos,

um outro fator de transcrição envolvido nessa cadeia já é naturalmente abundante na pele, sem a necessidade de exposição da mesma à radiação UV. A partir da combinação de c-jun e c-fos é formado o fator de transcrição de proteína 1 (AP-1). Por sua vez, AP-1 ativa os genes MMP, que estimulam a produção de colagenase, gelatinase e estromelisinase. A degradação de colágeno é mediada pela ativação de AP-1 e inibição do fator de transformação do crescimento (TGF- β). Pesquisas em seres humanos mostraram que com poucas horas de exposição à radiação UV, metaloproteinases, especificamente colagenase e gelatinase, foram produzidas (9). Dado que a colagenase ataca e degrada colágeno intacto, a longo prazo, elevações nos níveis de colagenases e outras metaloproteinases provavelmente resultem em colágenos desorganizados e agregados na pele fotoenvelhecida. Notavelmente, estas metaloproteinases podem representar o mecanismo pelo qual ocorre o declínio de colágeno tipo 1 em resposta à exposição à radiação UV. Portanto, o envelhecimento da pele (extrínseco e intrínseco) é marcado pela elevada atividade de AP-1 e expressão de MMP, inibição da sinalização de TGF- β , bem como reduzida síntese de colágeno e aumento na degradação de colágeno. Essas mudanças tendem a ser exacerbadas no fotoenvelhecimento (9,16).

A metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) é considerada importante para a degradação da membrana basal e da matriz extracelular durante o câncer e outros processos de remodelamento do tecido. Além do processo de remodelação, a MMP-9 também está envolvida na epitelização. Em experimentos feitos com camundongos MMP-9 nulo, por exemplo, foi observada uma reepitelização comprometida e reduzido *clearance* de fibrinas. Além disso, esses camundongos apresentaram deposição anormal de matriz, o que foi evidenciado pelo alinhamento irregular das fibras de colágeno (34-35).

Dessa forma, o equilíbrio entre a síntese e a degradação dos componentes da matriz extracelular, principalmente pelas MMPs, está intimamente relacionado ao processo de envelhecimento da pele.

1.4. ARGININA.

A *L*-arginina (figura 3), um aminoácido constituinte de várias proteínas do corpo humano, é o substrato da síntese de óxido nítrico e está, portanto, indiretamente envolvida em muitos mecanismos regulatórios importantes, tais como angiogênese e proliferação celular (36).

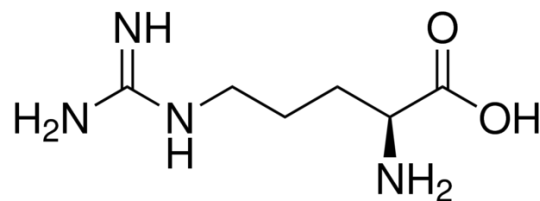


Figura 3. Molécula de *L*-arginina (37).

A arginina é naturalmente ingerida nas dietas numa taxa de 3,5 g/dia, e está particularmente presente em certos produtos alimentares, como carnes e nozes. Inicialmente considerado um aminoácido não essencial, é classificado atualmente como semi-essencial (38). Em humanos, a arginina é sintetizada em quantidades adequadas para sustentar a massa muscular e o tecido conjuntivo, mas provavelmente em quantidades insuficientes para a ideal biossíntese de colágeno e para o processo de cicatrização. Pode ser metabolizada por arginase formando ureia e ornitina. A ornitina (ORN) através da ação da ORN- γ -aminotransferase é convertida a semialdeído γ -glutâmico que é o *link* para a síntese de prolina (39). A participação da arginase tem sido suposta no processo de cicatrização de feridas, por afetar a proliferação celular local e, possivelmente, o metabolismo de colágeno (36). A suplementação de arginina na dieta de humanos e roedores tem um efeito significativo no processo de cicatrização de feridas. Animais tratados com *L*-arginina mostraram um aumento da força tênsil da cicatriz e da deposição de colágeno, comparado ao controle (40).

O óxido nítrico é sintetizado a partir da arginina e do O₂ (figura 4) por três isoformas de óxido nítrico sintetase (NOS), a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS induzível (iNOS). A disponibilidade de arginina

intracelular é um fator limitante para a produção de NO. As proteínas ingeridas são degradadas até arginina, a qual pode ser absorvida e metabolizada no fígado, no ciclo da ureia, ou ser transformada no epitélio intestinal em ornitina, que, juntamente com a glutamina que é secretada na forma de glutamato, são convertidas em citrulina. A citrulina absorvida pode ser transformada em arginina no ciclo renal ou diretamente em *L*-arginina no citoplasma das células endoteliais e dos macrófagos. No ciclo da ureia, a citrulina reage com o aspartato que oferece o segundo nitrogênio para a síntese da ureia e produz o argininosuccinato pela ação da argininosuccinato sintetase. O argininosuccinato formado é clivado pela argininosuccinato liase, dando origem ao fumarato e à arginina. A arginina é hidrolisada pela arginase produzindo a ureia e regenerando a ornitina, figura 5. Assim, a arginase e a NOS usam a arginina como um substrato comum, podendo competir pelo mesmo (41-42).

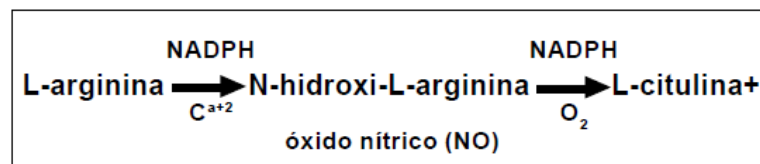


Figura 4. Síntese de óxido nítrico a partir da *L*-arginina (41).

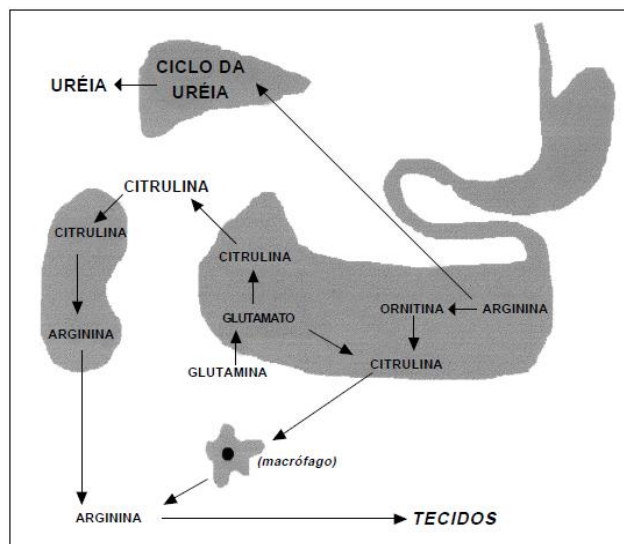


Figura 5. Esquema da absorção intestinal da arginina.

A arginina é absorvida diretamente ou pode ser transformada em ornitina e citrulina. A arginina absorvida diretamente vai para o ciclo da ureia. A citrulina é transportada para os rins onde é substrato da neossíntese de arginina. Em algumas células, como macrófagos, a citrulina também é transformada em arginina (41).

Foi observado que o NO regula o catabolismo de colágeno, desempenhando um importante papel no processo de cicatrização de feridas e deposição de colágeno. A atividade de iNOS é a fonte primária de NO no processo de cicatrização de feridas. Embora existam muitos estudos que indicam a inibição da síntese de colágeno pelo NO em vários tipos celulares, como arteríolas, células do músculo vivo vascular e células mesoteliais, foi encontrado que o NO induz a síntese de colágeno nos fibroblastos da lâmina própria do intestino delgado e a reepitelização no processo de cicatrização de feridas de pele normal. Esses estudos indicam que a iNOS e o NO participam do processo de cicatrização de feridas (43). A administração de inibidores de NOS resultou em um atraso na formação de colágeno e na reepitelização. Além disso, a dificuldade de cicatrização em diabéticos tem sido associada com a reduzida síntese de NO (40).

Xia e colaboradores (2006) demonstraram que o óxido nítrico pode aumentar a síntese de colágeno em células de tendão humano *in vitro*, e sugeriram que esses resultados poderiam explicar, em parte, os efeitos benéficos dos doadores de óxido nítrico (NO) em modelos animais e durante o tratamento de tendinopatias em ensaios clínicos em humanos (44). Chu e Prasad, 1999, mostraram que há uma correlação inversa significativa do nível de NO com a produção de colágeno, sugerindo o envolvimento da sinalização de NO na modulação da produção de colágeno (45).

As moléculas de colágeno são sintetizadas inicialmente como um precursor, o pró-colágeno. Na molécula de pró-colágeno estão os resíduos de prolina que sofrem hidroxilação pós-translacional pela prolil hidroxilase dando origem aos resíduos de hidroxiprolina, aminoácidos constituintes do colágeno (46). Bioquimicamente, um terço da molécula de colágeno é composto por glicina, o próximo componente em maior concentração é a prolina e seu derivado hidroxiprolina que, juntos, formam 23% da molécula de colágeno (39). A prolina usada para a biossíntese de colágeno em fibroblastos pode ser derivada de glutamina, glutamato ou ornitina. Em experimentos realizados no fluido de feridas, a origem metabólica da glutamina e do glutamato permanece desconhecida, mas sabe-se que a ornitina pode ser sintetizada localmente através do catabolismo da arginina pela arginase. A fonte de arginase extracelular nos sítios inflamatórios ainda não é conhecida, mas

provavelmente esta é liberada a partir dos macrófagos, por um processo de secreção ativa ou como consequência da morte celular (47). Em alguns eventos, os resultados são um decréscimo significativo no conteúdo de arginina livre no espaço extracelular e concentrações de ornitina seis vezes maiores do que no plasma. O acúmulo de ornitina no espaço da ferida pode ser visto como uma vantagem no processo de cicatrização, isso porque a ornitina é um metabólito precursor da prolina e, assim, da síntese de colágeno. Com efeito, foi demonstrado que o tamanho do *pool* de prolina determina a taxa da síntese de colágeno e que a síntese local de prolina a partir de seus precursores metabólicos, como a ornitina, arginina, glutamato e glutamina, é reforçada nessas circunstâncias, aparentemente para compensar a deficiência relativa da prolina pré-formada (39). Vários trabalhos têm mostrado a relação da arginina com a síntese e deposição de colágeno.

Baseado nisso, surgiu a ideia de avaliar a influência da *L*-arginina na elasticidade da pele e a possibilidade de usá-la como ativo cosmético.

1.5. RETENÇÃO, PENETRAÇÃO E PERMEABILIDADE CUTÂNEA.

A pele abrange uma área superficial de mais ou menos 2 m² e sua espessura é de aproximadamente 2,97 mm. Além do estrato córneo, parte mais externa em contato direto com o meio ambiente, da epiderme e da derme, onde estão os vasos capilares que permitem a chegada dos medicamentos na circulação sistêmica, é importante citar os anexos cutâneos que compõem a pele, como os pelos, cerca de 10 a 70 em cada cm², e as glândulas sudoríparas, cerca de 200 a 250 em cada cm², o que varia de acordo com a região do corpo (48-49).

O estrato córneo é composto por células queratinizadas e mortas, os corneócitos, que estão organizados em aproximadamente 20 camadas, garantindo ao estrato uma espessura de cerca de 10 µm. Sua principal função é impedir a perda excessiva de água para o meio ambiente, retendo a umidade, manter a coesão celular e controlar a descamação (48). O estrato córneo é a barreira principal para a permeação de fármacos, sendo, assim, um passo limitante para a permeação cutânea (49).

Existem duas vias para a penetração de substâncias na pele, a via transepidérmica e os anexos cutâneos. A via transepidérmica utiliza duas rotas distintas, a intracelular e a intercelular. Pela rota intracelular, a substância passa através das células do estrato córneo, percorrendo caminhos hidro e lipofílicos, e é uma rota geralmente percorrida por substâncias hidrofílicas. Pela rota intercelular, a substância penetra a pele passando entre os corneócitos. A penetração pelos anexos cutâneos é considerada de menor importância, uma vez que os anexos cutâneos representam uma pequena fração da superfície da pele, cerca de 0,1%. No entanto, essa via pode ser importante para penetração de grandes moléculas polares que não conseguem passar pela via transepidérmica. A rota através da qual vai ocorrer a penetração é amplamente dependente das características físico-químicas da substância, sendo a mais importante destas o coeficiente de partição óleo-água da substância, figura 6 (49).

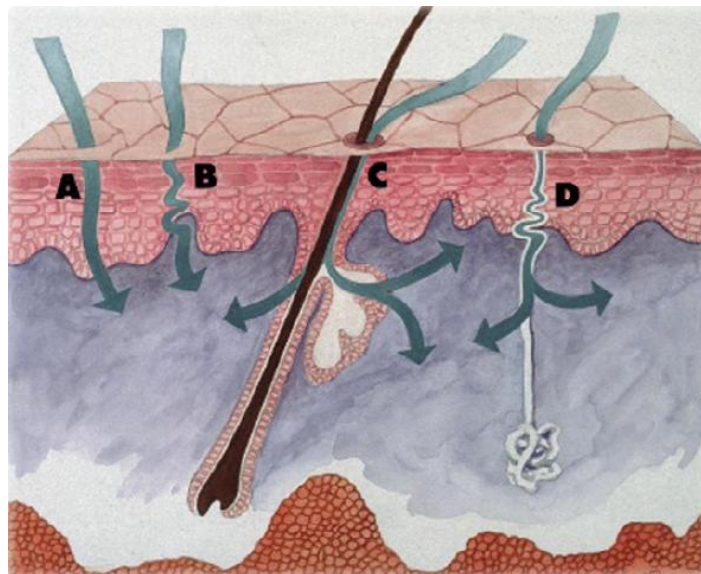


Figura 6. Modelo esquemático das vias de penetração cutânea.

(A) e (B), penetração transepidérmica, (C) e (D), anexos cutâneos. (A) estrato córneo intracelular, (B) estrato córneo intercelular, (C) folículo piloso e (D) ducto sebáceo (50).

Se o fármaco penetrar no estrato córneo, ele pode entrar na corrente sanguínea por difusão passiva (51). Então, para ocorrer a permeação transdérmica os principais passos são: adsorção da substância nas camadas superficiais do estrato córneo, difusão através do estrato córneo e da epiderme e, finalmente, permeação através da derme papilar na microcirculação, figura 7 (49).

Fases da permeação cutânea

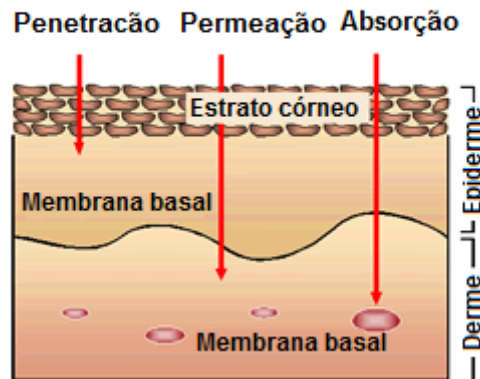


Figura 7. Fases da penetração cutânea.
Penetração, permeação e absorção (52).

A capacidade de penetração e permeação dos produtos farmacêuticos ou cosméticos na pele é de extrema importância para a eficácia dessas substâncias. Idealmente, os estudos de penetração e permeação cutânea através da pele deveriam ser feitos com a pele humana, mas a inviabilidade desta condição ideal de utilização da pele humana para esses estudos conduz os estudos às alternativas existentes, como em membranas sintéticas, culturas tridimensionais e modelos animais. No Brasil, a pele da orelha de porco é amplamente utilizada, devido a sua disponibilidade e principalmente por ser semelhante ao tecido humano quanto à densidade de folículos pilosos (53).

Segundo o *Guidance for Industry* da *Food and Drug Administration* (FDA), o método para avaliar a liberação *in vitro* de formulações tópicas se baseia no uso do sistema de células de Franz, que é geralmente equipado com uma membrana sintética (54). Os estudos de penetração e permeação são de suma importância para avaliar se a substância estudada alcançará sua função esperada no local desejado.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da administração tópica da *L*-arginina na elasticidade da pele de camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Avaliar a eficácia *in vivo* da *L*-arginina na elasticidade da pele de camundongos pela aplicação tópica na região abdominal de dispersões de *L*-arginina nas concentrações de 5%, 10% ou 15%, durante 15 dias de tratamento;
- Avaliar a elasticidade da pele utilizando a medida da força tênsil pelo equipamento do tipo VersaTest[®], acoplado a um dinamômetro;
- Avaliar morfológicamente as fibras colágenas, pela coloração de Tricômio de Masson, e as fibras elásticas, pela coloração de Verhoeff;
- Avaliar a expressão de iNOS utilizando a técnica de imunohistoquímica;
- Determinar o coeficiente de partição óleo/água da *L*-arginina;
- Determinar a penetração e eventual permeação das dispersões de *L*-arginina em glicerol, nas concentrações de 5%, 10% e 15%, na pele suína;
- Padronizar o método de quantificação de *L*-arginina pelo método fotométrico;
- Avaliar a atividade proteolítica das metaloproteinases contidas na pele dos camundongos submetidos ao tratamento com dispersões de *L*-arginina.

3. MATERIAS E MÉTODOS.

3.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:

- Agitador Biomixer QL-901;
- Agitador de tubos MS1 – Minishaker - IKA®;
- Agitador magnético - Variomag® - Electronicrührer Multipoint HP6;
- Balança analítica AG204 DeltaRange® - Metler Toled;
- Balança analítica AND HR-202;
- Banho de água com temperatura controlável - Braun Thermomix 18BU;
- Células de Franz;
- Centrífuga Eppendorf 5810 R;
- Centrífuga Jouan BR4i 17cm;
- Centrífuga Sigma 2k15 2000 n73310
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601;
- Espectrofotômetro U-2001 – Hitachi;
- Freezer Nuare -85°C ultralow NU65-18G;
- Geladeira Eletrolux Air flow DC 48;
- Microscópio AxioImager A1, Zeiss, acoplado a computador com *software* de processamento de imagem digital AxioVision®;
- Microscópio Olympus BX41, TSView1;
- pHmetro digital microprocessado Del Lab DLA-PH;
- Scanscope Aperio;
- Tensiômetro VersaTest®;
- Banho de água com Ultra-som – Thorton – T14.

3.2. PREPARO DAS DISPERSÕES DE L-ARGININA.

Foram preparadas dispersões de *L*-arginina nas concentrações de 5, 10 e 15% em glicerol para verificação da sua eficácia *in vivo* na elasticidade da pele de camundongos.

3.3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DA L-ARGININA NA ELASTICIDADE DA PELE DE CAMUNDONGOS.

Para a avaliação da influência da *L*-arginina na elasticidade da pele foram utilizados camundongos Swiss de diferentes faixas etárias, de modo a obter grupos representativos (n = 5) de jovens (4 a 6 semanas de idade), adultos (11 a 13 semanas de idade), idosos (mais de 20 semanas de idade), fêmeas e machos, pesando entre 20 e 25 g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, sob condições controladas de luz e à temperatura ambiente, com água e ração padronizada *ad libitum*. Para avaliação da eficácia *in vivo* da *L*-arginina na elasticidade da pele, os camundongos receberam uma aplicação tópica de uma alíquota de 0,5 g das dispersões de *L*-arginina, nas diferentes concentrações, por 15 dias. A aplicação do diluente utilizado no preparo das suspensões foi utilizado como grupo 0 (zero) e a ausência de aplicações foi utilizada como grupo controle. Após o período de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia na câmara de dióxido de carbono. Foi, então, realizada uma tricotomia da região abdominal e amostras de pele, de aproximadamente 3 cm, foram retirados do animal. Fragmentos deste tecido retirado foram removidos, fixados em formol tamponado e processados para avaliação histológica. Outros fragmentos da pele foram mantidos sob refrigeração a -80°C para posterior análise. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e realizados sob aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília (Processo nº 47217/2009 – Anexo I).

3.4. AVALIAÇÃO DA ELASTICIDADE DA PELE.

As amostras de tecido removidas dos animais em estudo foram mantidas úmidas por adição de solução fisiológica às mesmas. Os tecidos tiveram sua elasticidade avaliada por medida da força tênsil, com auxílio de um equipamento do tipo VersaTest[®], com um dinamômetro acoplado. As amostras foram estiradas até sua ruptura e a força de tração máxima tolerada pelo tecido foi, assim, determinada.

3.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.

Fragmentos da pele retirada dos animais após o tratamento foram imersos em solução de formol a 10%, onde permaneceram por 48 h e, após este período, receberam os procedimentos de rotina histológica para inclusão em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 5 µm de espessura, transversais em relação ao maior eixo do fragmento da pele. Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina, para a análise morfológica do tecido, Tricrômio de Masson, para a análise das fibras colágenas (55) e método de Verhoeff, para observação de fibras elásticas (56). Os cortes foram analisados em microscópio óptico e as análises foram baseadas nas características histológicas do tecido comparado ao tecido do grupo controle.

Os cortes dos tecidos foram também submetidos à técnica de imunohistoquímica, pela técnica de imunoperoxidase, para análise da expressão de iNOS. As lâminas histológicas foram desparafinizadas com xilol e alcoóis graduados. Foram aquecidas em tampão citrato 10 mM, pH 6,0, a 96°C, durante 10 minutos e posteriormente resfriadas à temperatura ambiente. O anticorpo policlonal *Rabbit Anti-Human Nitric Oxide Synthase-Inducible* (iNOS) (Spring, código E3740), foi diluído com diluente de anticorpo (Spring, código ADS-125) na proporção de 1:100 e adicionado às lâminas arrefecidas, que permaneceram nesta solução por 10 minutos. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas com PBS

contendo 0,05% de Tween 20 e incubadas, à temperatura ambiente por 30 minutos, com o polímero (Nichirei, Cód. 414341F). As lâminas foram novamente lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e posteriormente, sobre estas, foi adicionada a 3,3'diaminobenzidina (DAB, Spring, código DAB-125), diluído na proporção de 1:50 em tampão diluente de DAB, e mantida por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e contra coradas com hematoxilina. Para o controle positivo e negativo foram utilizados cortes de pulmão. No controle negativo todas as etapas foram realizadas, exceto a aplicação do anticorpo primário, nessa etapa foi adicionado somente o diluente de anticorpo.

3.6. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE LIPOFILIA DA *L*-ARGININA - DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO/ÁGUA ($K_{O/A}$).

Para avaliar o coeficiente de partição óleo/água da *L*-arginina, o octanol foi saturado com água sob agitação e, posteriormente, os dois solventes foram separados. A fase oleosa (octanol) foi guardada em geladeira e a fase aquosa foi saturada com o aminoácido por agitação *overnight*. Após o preparo da solução saturada de *L*-arginina, esta foi filtrada e submetida à partição líquido-líquido com o octanol. Um controle contendo água e octanol, sem arginina, também foi preparado para ser usado como branco. A fase aquosa de cada amostra, inclusive controle, foi então separada e submetida à centrifugação (57). A concentração de *L*-arginina presente na fase aquosa foi determinada segundo metodologia descrita por Moore (58). A concentração de *L*-arginina na fase aquosa de cada amostra foi quantificada antes (C_1) e depois da partição com octanol (C_2) e o $K_{O/A}$ foi determinado segundo a equação (57):

$$K_{O/A} = \frac{C_1 - C_2}{C_2}$$

O grau de lipofilia da *L*-arginina foi determinado pela obtenção do logaritmo da base 10 do coeficiente de partição óleo/água.

3.7. ENSAIO DE RETENÇÃO, PENETRAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA.

O teste de permeação *in vitro* foi realizado em células de difusão de Franz equipadas com pele de orelhas de suínos. As orelhas de suínos foram obtidas em frigoríficos, retiradas antes que o animal tivesse sido escaldado, e lavadas em água corrente. A pele da parte externa da orelha foi cuidadosamente descolada com bisturi e o excesso de gordura subcutânea foi retirado com auxílio de tesoura e pinça (figura 8). As peles foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2 cm, de acordo com o orifício das células de Franz, embaladas em papel alumínio e armazenados em freezer (-20°C) por, no máximo, sessenta dias.



Figura 8. Preparação da pele de orelha suína.

(a) Orelha de suíno lavada e não escaldada, (b) retirada da pele com auxílio de um bisturi, (c) retirada do excesso de gordura subcutânea com auxílio de tesoura e pinça, (d) fragmento de pele pronto para ser utilizado (59).

Inicialmente foi feito o teste de recuperação do aminoácido da pele, a fim de validar o método de detecção da *L*-arginina. O estrato córneo da pele suína foi retirado pelo método de *tape stripping*, usando fita adesiva, com aplicação da fita por 15 vezes. Diferentes fragmentos de pele suína foram tratados com uma solução de

L-arginina em metanol, na concentração de 2 mg/mL, por aplicação de 300 µL, 600 µL, 900 µL da solução de *L*-arginina ou somente metanol na pele, este último usado como o branco. Após a aplicação, a pele foi picotada e colocada em tubo de ensaio cônico, juntamente com 1,5 mL de água. O material foi imerso por 30 minutos no banho de água com ultrassom, depois agitado em agitador do tipo vórtex por 1 minuto e, finalmente, centrifugado a 2.113 *xg* a 25°C por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e o processo todo foi repetido. Ao sobrenadante, resultante das duas etapas do processo de extração, foi acrescentada uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 80% na proporção de 234 µL de TCA para cada 1,5 mL de amostra, a fim de precipitar as proteínas da pele. Após agitação em agitador do tipo vórtex, a solução ficou em repouso por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foi centrifugada a 23.478 *xg*, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante resultante teve o pH ajustado para 5,2 com solução de NaOH 50% ou HCl 1N e foi submetido à quantificação de aminoácidos pelo método de Moore.

A quantificação da *L*-arginina no ensaio de permeação foi semelhante ao descrito para o teste de recuperação.

Para o teste de penetração, as células de difusão de Franz foram montadas de acordo como a figura 9. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato 150 mM, pH 7,2, para mimetizar condições semelhantes ao sangue. A pele da orelha suína foi disposta na célula deixando a derme em contato direto com a solução receptora. Acima da pele foi colocado um anel de teflon com um orifício, onde foram aplicadas as dispersões de *L*-arginina nas diferentes concentrações (5%, 10% ou 15%). O compartimento receptor foi mantido sob agitação por 12 horas. As células foram mantidas a 37°C pela circulação de água com temperatura controlada. As células foram desmontadas, o excesso da formulação foi retirado e as peles foram submetidas ao tratamento para a recuperação da *L*-arginina, como descrito anteriormente.

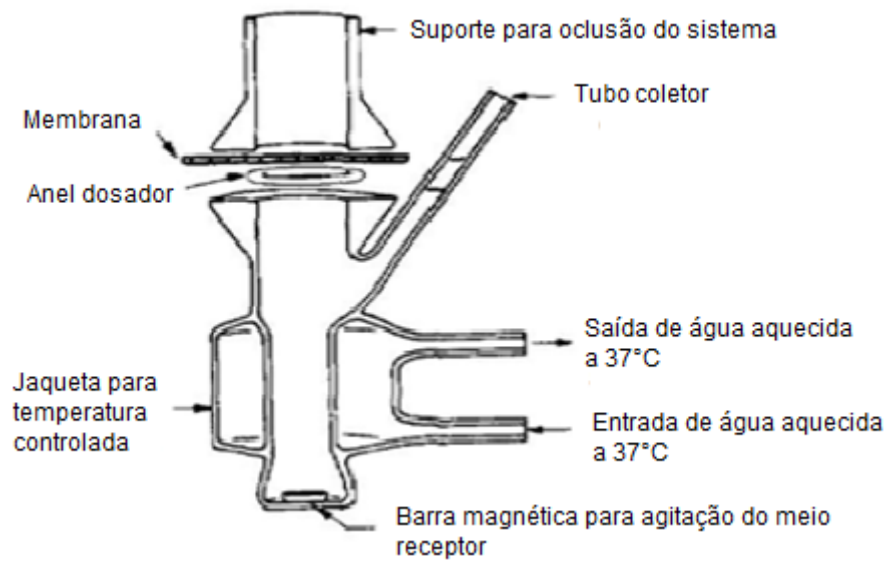


Figura 9. Imagem esquemática da célula de difusão de Franz. Praça, 2010 (50).

3.8. QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDO.

A quantificação de aminoácidos foi feita pelo método de Moore (58). Para isso, foram adicionados 500 μL de solução de ninidrina a 2% a 100 μL de amostra. O meio reacional foi agitado e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 3,5 mL de propanol a 50% ao meio reacional. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570nm. Para a confecção do branco, a amostra foi substituída por água destilada. Uma curva padrão da *L*-arginina foi feita utilizando concentrações de 300 $\mu\text{g/mL}$ a 1200 $\mu\text{g/mL}$ do aminoácido.

3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE METALOPROTEINASE POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

Os fragmentos de pele dos camundongos, tratados ou não, mantidos sob refrigeração a -80°C , foram pesados e picotados. Para cada 1 g de pele foram adicionados 4 mL do tampão Tris 50 mM contendo CaCl_2 10 mM, pH 7,4, adicionado dos inibidores de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma-Aldrich) 0,2 M, fenantrolina (PHE, Sigma-Aldrich) 0,2 M e N-etilmaleimida (NEM, Sigma-Aldrich)

0,2 M. As peles adicionadas do tampão com os inibidores foram homogeneizadas em turrax e mantidas a 4°C *overnight*. As amostras foram então centrifugadas duas vezes por 10 minutos a 9.168 xg a 4°C. O sobrenadante foi retirado e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (60). As amostras foram avaliadas por eletroforese para detecção da atividade de proteinase em gel de poliacrilamida contendo gelatina e para detecção de proteínas.

3.10. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS.

A placa de gel para a eletroforese para detecção de proteína foi montada com um gel de concentração (5%) e 5 cm de gel de separação (10%) contendo:

<input type="checkbox"/>	Acrilamida:bis-acrilamida (30:0,8)	3,3 mL
<input type="checkbox"/>	Tris/HCl 3 M pH 8,8 com 0,4% de SDS	2,5 mL
<input type="checkbox"/>	Água deionizada	3,9 mL
<input type="checkbox"/>	Solução de Temed 10% em água	10 µL
<input type="checkbox"/>	Solução de persulfato de amônio 10% em água	40 µL

O gel para avaliação de atividade proteinase foi acrescido de 1% de gelatina. Nas cubas foi utilizado o tampão Tris/glicina 25 mM, pH 8,3, contendo 0,1% de SDS (61). As amostras foram diluídas 1:1 em sistema tampão SDS-descontínuo constituído por tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,7, 8% de SDS, 12% de glicerol e 0,003% de azul de bromofenol. Antes da aplicação, a amostra diluída neste tampão permaneceu em banho de água a 37°C por 8 minutos. O volume de amostra aplicado foi o equivalente a 40 µg de proteína

O gel foi submetido a uma pré-corrída de 15 minutos a 100 V. Durante a eletroforese, a corrente aplicada foi também de 100 V, e esta corrente foi mantida constante até que o corante tivesse migrado totalmente pelo gel de concentração, após este período a corrente foi ajustada para 150V.

Ao término da eletroforese, o gel de poliacrilamida foi lavado rapidamente com água destilada e incubado com solução de Triton X100 a 2% por 1 hora. Após esse período o Triton-X100 foi retirado, o gel foi lavado com água destilada e incubado em tampão Tris 50 mM contendo CaCl₂ 10mM, pH 7,4 , a 37°C *overnight*.

Após este período o gel foi submetido à coloração específica para detecção de proteínas, utilizando o corante Comassie Blue R350 (Phast Gel Blue R – Pharmacia Biotech) diluído 1:1 em solução de ácido acético a 20%. Após a coloração, o excesso de corante foi removido com solução de ácido acético a 20%.

O marcador de proteínas BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder foi utilizado para construção da curva padrão e determinação das massas moleculares das proteínas analisadas.

3.11. DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE LOWRY.

A dosagem de proteínas foi feita pelo método descrito por Lowry e colaboradores (60), usando a soro albumina bovina como padrão.

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados obtidos nos ensaios foram avaliados estatisticamente. Para verificar se testes paramétricos ou não-paramétricos deveriam ser empregados, foram realizados testes preliminares de normalidade da distribuição amostral e, quando pertinentes, o teste *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações foram utilizados.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA ELASTICIDADE DA PELE *IN VIVO*.

Amostras de pele dos camundongos submetidos ao tratamento com as diferentes concentrações de *L*-arginina, somente glicerol ou nenhum tratamento foram retiradas e estas foram submetidas à avaliação de sua resistência mecânica à tração com o auxílio de um VersaTest[®] acoplado a um dinamômetro. Os resultados obtidos neste ensaio estão demonstrados nas figuras 10 a 15.

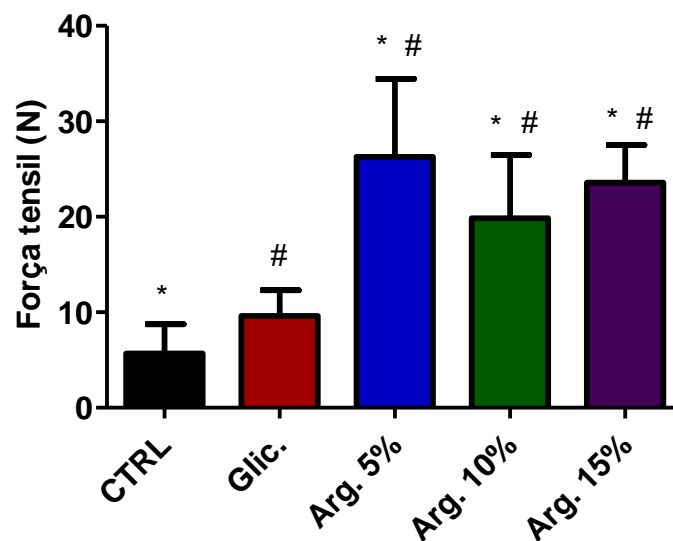


Figura 10. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos machos idosos.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). * e #, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

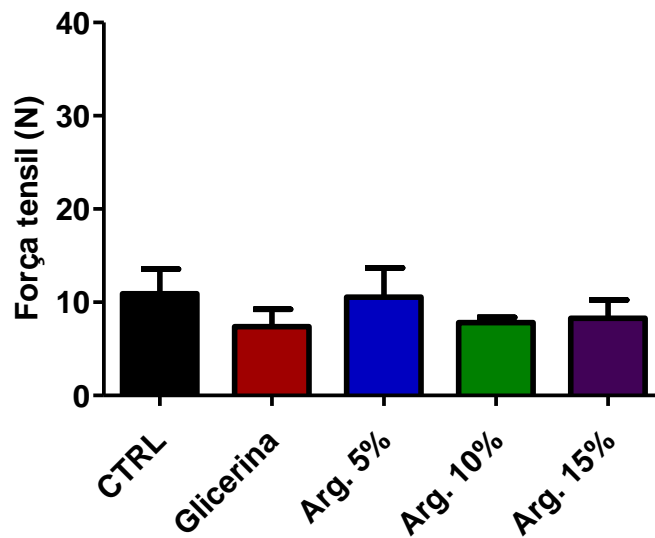


Figura 11. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos machos adultos.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL); n = 5.

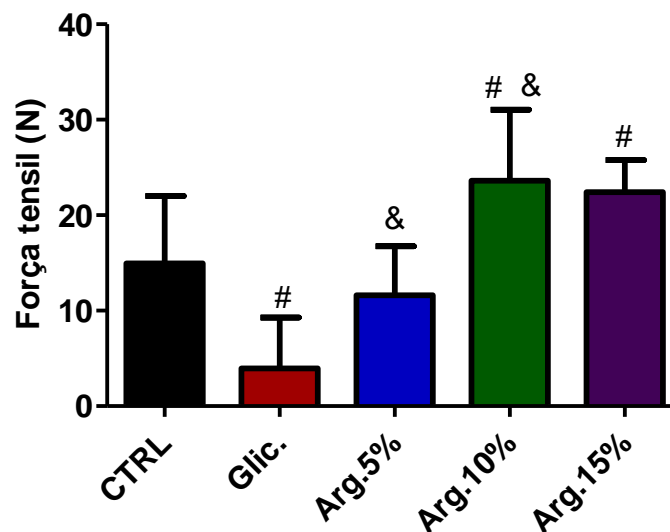


Figura 12. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos machos jovens.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). # e &, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; n = 5.

As figuras 10 a 12 mostram os resultados obtidos para o tratamento de camundongos machos. Pode-se observar que para camundongos machos o tratamento com *L*-arginina, em qualquer das concentrações testadas, produziu uma diferença significativa na força tênsil necessária para ruptura da pele de camundongos machos idosos. Houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com *L*-arginina e do grupo tratado somente com glicerol e os grupos tratados com *L*-arginina. Para camundongos machos adultos, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o controle. Os experimentos realizados em camundongos machos jovens mostraram diferença significativa na resistência mecânica da pele do grupo tratado somente com glicerina com os grupos tratados com dispersões de *L*-arginina nas concentrações de 10% e 15% e entre o grupo tratado com *L*-arginina na concentração de 5% e o grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10%.

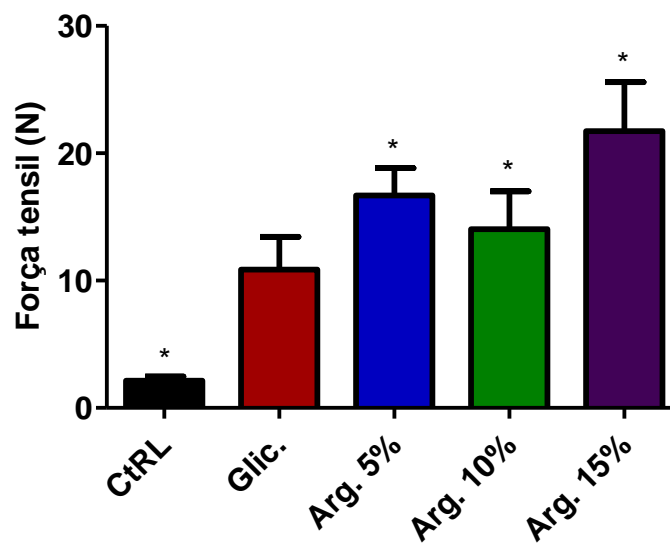


Figura 13. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos fêmeas idosas. Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). *, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

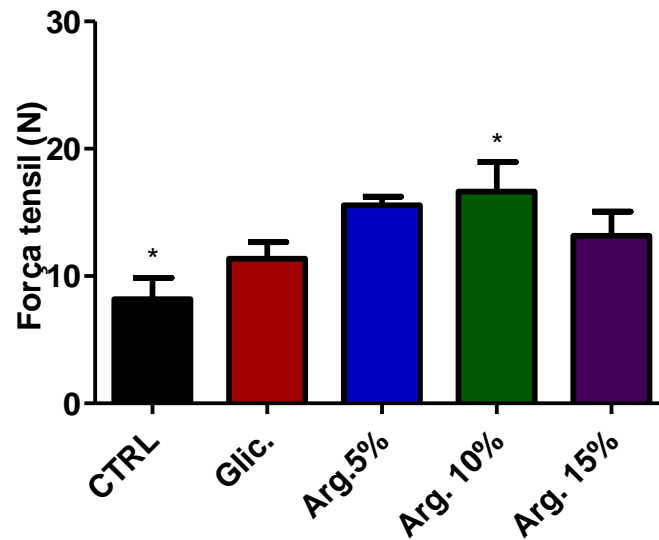


Figura 14. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos fêmeas adultas.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg. 10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). *, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

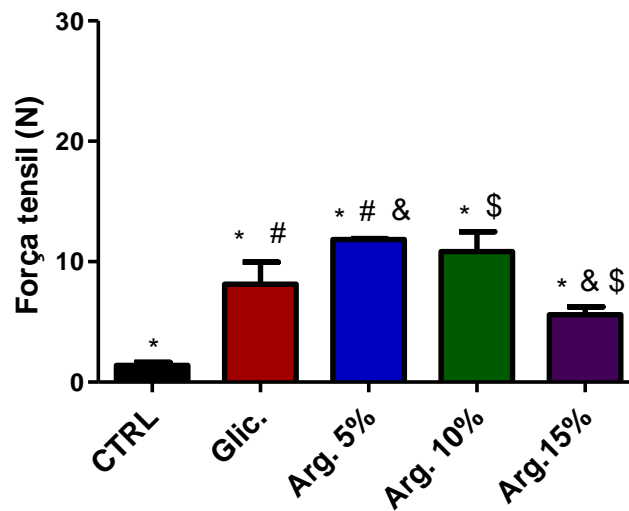


Figura 15. Avaliação da resistência mecânica à tração da pele de camundongos fêmeas jovens.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg. 10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). *, #, & e \$, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

As figuras 13 a 15 mostram os resultados obtidos para o tratamento de camundongos fêmeas. Pode-se observar que, para camundongos fêmeas idosas, o tratamento com *L*-arginina, em qualquer das concentrações testadas, produziu uma diferença significativa na força tênsil necessária para ruptura da pele. Houve uma diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados com *L*-arginina, sendo que essa diferença foi maior para o grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 15%. Para camundongos fêmeas adultas, houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10%. Os experimentos realizados em camundongos fêmeas jovens mostraram diferença significativa na resistência mecânica da pele entre o grupo controle com os demais grupos, entre o grupo tratado somente com glicerol e o grupo tratado com *L*-arginina a 5%, entre o grupo tratado com *L*-arginina a 5% e o grupo tratado com *L*-arginina a 15% e entre o grupo tratado com *L*-arginina a 10% e o grupo tratado com *L*-arginina a 15%.

4.2. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.

4.2.1. Avaliação das fibras de colágeno.

As amostras das peles dos camundongos foram processadas para o estudo histológico e coradas pelo método de Tricômio de Masson para a avaliação das fibras colágenas. As lâminas obtidas foram analisadas por intensidade de coloração das fibras, por dois observadores distintos, e os resultados obtidos para camundongos machos e fêmeas estão apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Avaliação das fibras colágenas na pele de camundongos machos.

Grupo		Intensidade	
Macho	Idoso	CTRL	+++
		Glicerol	+++
		Arg. 5%	++
		Arg. 10%	++
		Arg. 15%	++
	Adulto	CTRL	+++
		Glicerol	++
		Arg. 5%	+++
		Arg. 10%	+++
		Arg. 15%	+++
	Jovem	CTRL	++
		Glicerol	+++
		Arg. 5%	++
		Arg. 10%	++
		Arg. 15%	+++

A análise qualitativa de fibras colágenas foi feita por dois observadores, em consenso. As intensidades das fibras colágenas foram pontuadas como: -, negativa; +, quantidade de fibras superior a 0% mas inferior a 30%; ++, quantidade de fibras superior 30% mas inferior a 70%; +++, quantidade de fibras superior 70%.

Na tabela 1 estão apresentados os resultados das análises das lâminas coradas para evidenciação de fibras colágenas da pele de camundongos machos. No grupo dos idosos, o grupo controle (CTRL) e o grupo tratado somente com glicerol apresentaram uma intensidade de coloração de fibras colágenas superior a 70%, figura 16. Já os grupos tratados com dispersões de *L*-arginina apresentaram uma quantidade de fibras colágenas coradas entre 30% e 70%. No grupo de camundongos adultos, somente o grupo tratado com glicerol apresentou uma menor quantidade de fibras colágenas, quando comparado ao grupo CTRL, os demais grupos não apresentaram diferenças na intensidade de coloração das fibras colágenas. No grupo de camundongos jovem, as animais tratados com glicerol e dispersão de *L*-arginina a 15% foram os que apresentaram maior quantidade de fibras colágenas, os demais grupos apresentaram fibras colágenas com intensidade de coloração entre 30 e 70%.

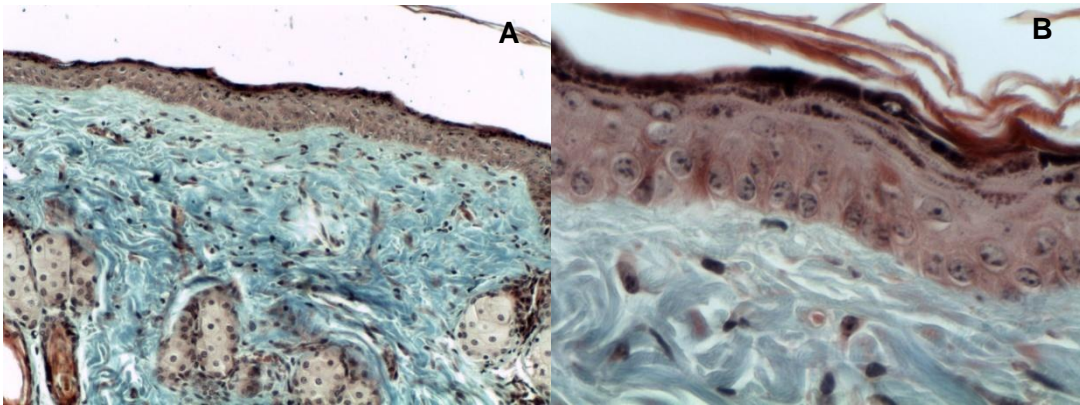


Figura 16. Análise de fibras colágenas na pele de camundongos machos idosos.

Análise de fibras colágenas na pele de camundongos machos idosos do grupo controle (CTRL). Coloração de Tricômio de Masson. (A) Aumento de 100x e (B) aumento de 400x.

Tabela 2 - Avaliação das fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas.

Grupo		Intensidade	
Fêmea	Idosa	CTRL	++
		Glicerol	+++
		Arg. 5%	++
		Arg. 10%	++
		Arg. 15%	+++
	Adulta	CTRL	+
		Glicerol	++
		Arg. 5%	++
		Arg. 10%	+++
		Arg. 15%	+
	Jovem	CTRL	+++
		Glicerol	++
		Arg. 5%	+++
		Arg. 10%	++
		Arg. 15%	+++

A análise qualitativa de fibras colágenas foi feita por dois observadores, em consenso. As intensidades das fibras colágenas foram pontuadas como: -, negativa; +, quantidade de fibras superior a 0% mas inferior a 30%; ++, quantidade de fibras superior 30% mas inferior a 70%; +++, quantidade de fibras superior 70%.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados das análises das fibras colágenas da pele de camundongos fêmeas. No grupo das idosas, as peles tratadas com glicerol (figura 17) e dispersão de *L*-arginina a 15% apresentaram uma coloração de fibras colágenas com intensidade acima de 70%, os demais grupos

apresentaram uma menor intensidade de coloração de fibras colágenas. No grupo das adultas, o grupo CTRL e o grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 15% apresentaram uma coloração de fibras com intensidade abaixo de 30%, em contrapartida o grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10% apresentou uma coloração com intensidade acima de 70%, figura 18. Por fim, no grupo de camundongos jovens, os camundongos do grupo CTRL, dos grupos tratados com dispersão de *L*-arginina a 5% e a 15% apresentaram, na análise histológica, lâminas das fibras colágenas com intensidade de coloração acima de 70% e os demais grupos apresentaram intensidade coloração de fibras colágenas entre 30% e 70%.

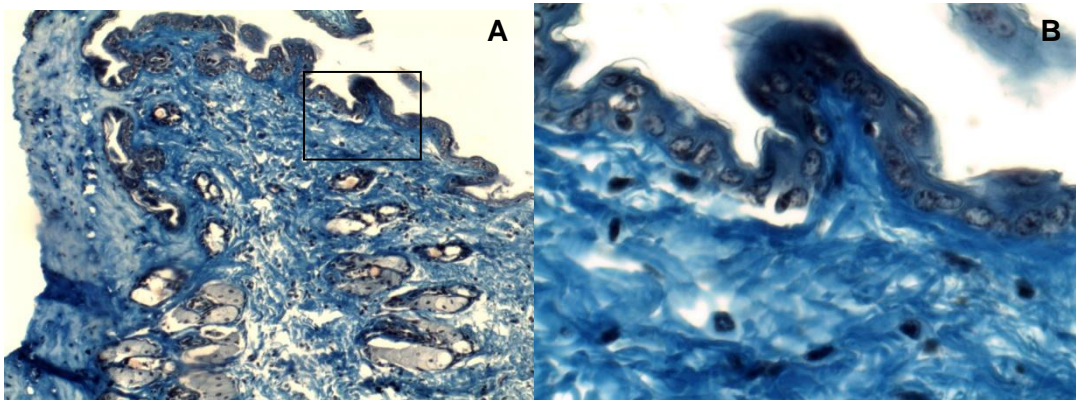


Figura 17. Análise de fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas idosas.

Análise de fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas idosas tratadas somente com glicerol. Coloração de Tricômio de Masson. (A) Aumento de 100x e (B) aumento de 400x.

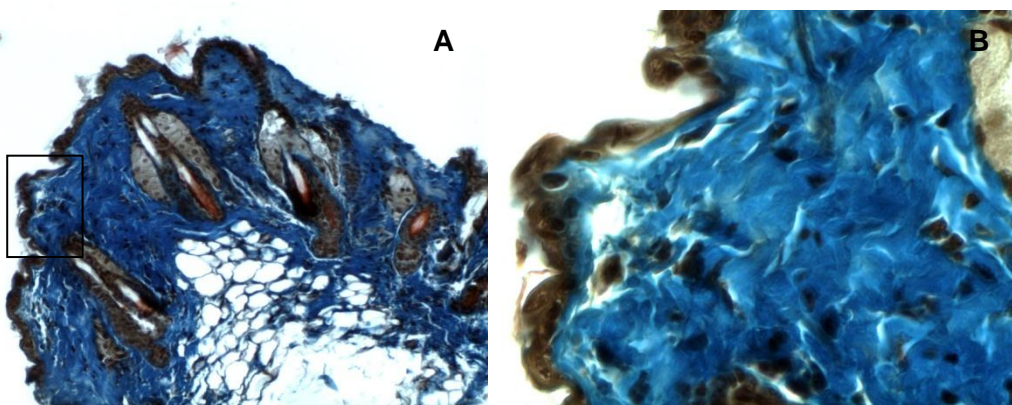


Figura 18. Análise de fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas adultas.

Análise de fibras colágenas na pele de camundongos fêmeas adultas tratadas com dispersão de *L*-arginina a 10%. Coloração de Tricômio de Masson. (A) Aumento de 100x e (B) aumento de 400x.

4.2.2. Avaliação das fibras elásticas.

As amostras das peles dos camundongos foram submetidas à coloração pelo método de Verhoeff para evidenciação de fibras elásticas. As lâminas obtidas foram analisadas por contagem de fibras em três campos distintos e aleatórios de um retículo quadriculado com $0,01 \text{ mm}^2$ de área, dividido em 100 partes iguais. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 19 a 24.

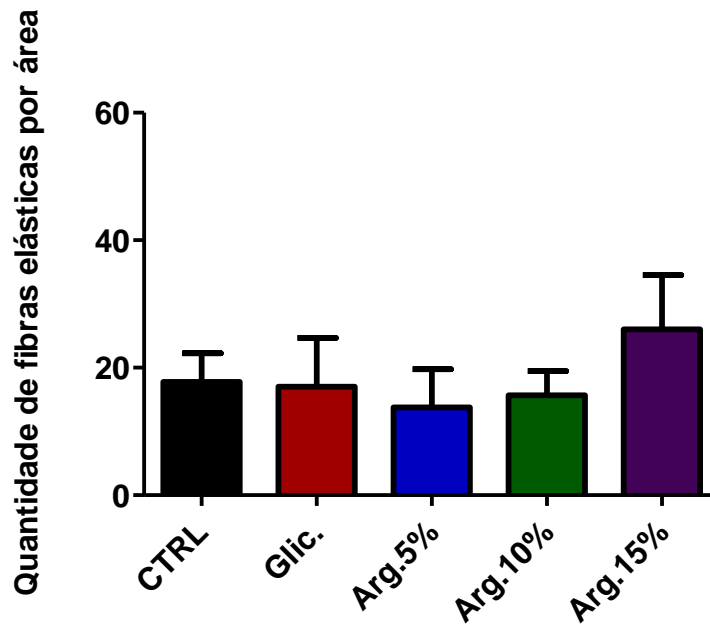


Figura 19. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos machos idosos.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL), $n = 5$.

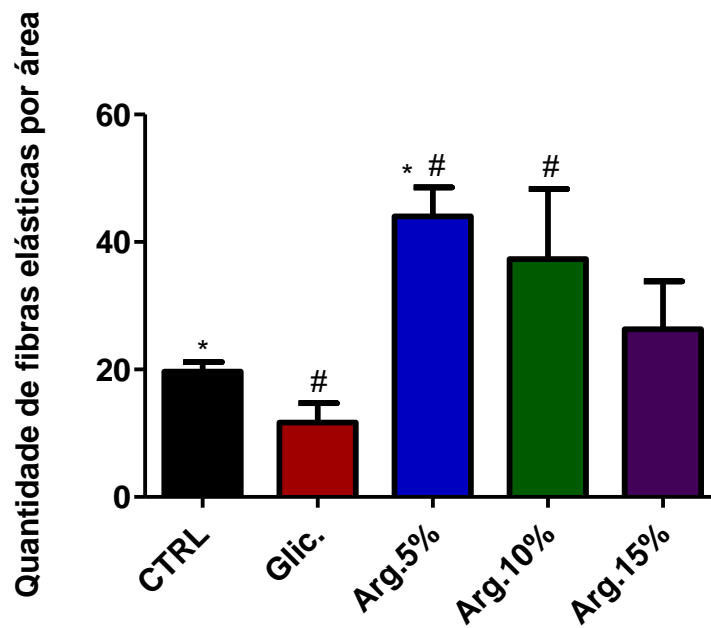


Figura 20. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos machos adultos.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). * e #, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

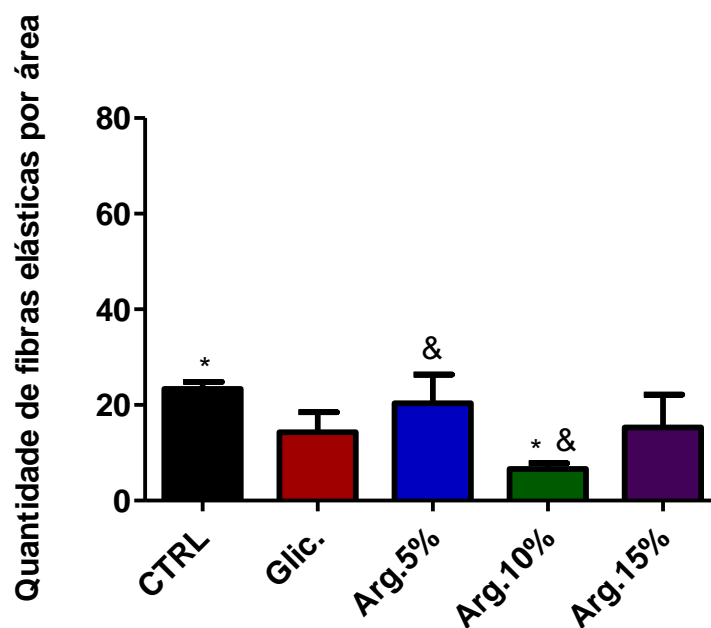


Figura 21. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos machos jovens.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). * e &, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

As figuras 19 a 21 mostram a contagem de fibras elásticas por área, na pele dos camundongos machos. Na figura 19 foi possível observar que não houve diferença na quantidade de fibras elásticas na pele dos camundongos idosos machos, quando foram comparados os animais do grupo CTRL e os dos grupos tratados. Na figura 20, no grupo dos adultos machos, houve diferença significativa no número de fibras elásticas na pele dos animais do grupo CTRL e daqueles tratados com dispersão de *L*-arginina a 5% e entre os animais do grupo tratado com glicerina e os dos grupos tratados com dispersão de *L*-arginina a 5% e a 10%. Já na figura 21, no grupo dos jovens machos, houve diferença significativa no número de fibras elásticas da pele dos animais do grupo CTRL e os do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10% e entre os animais do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 5% e a 10%.

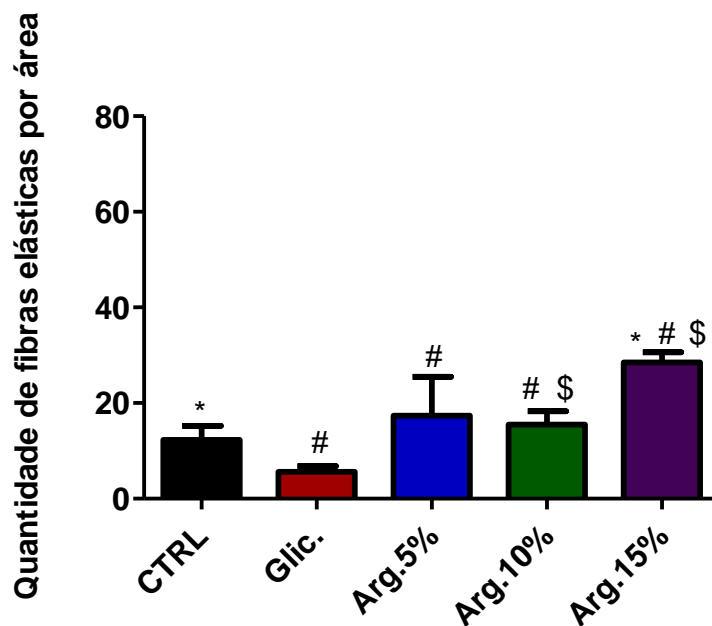


Figura 22. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas idosas.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). *, # e \$, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

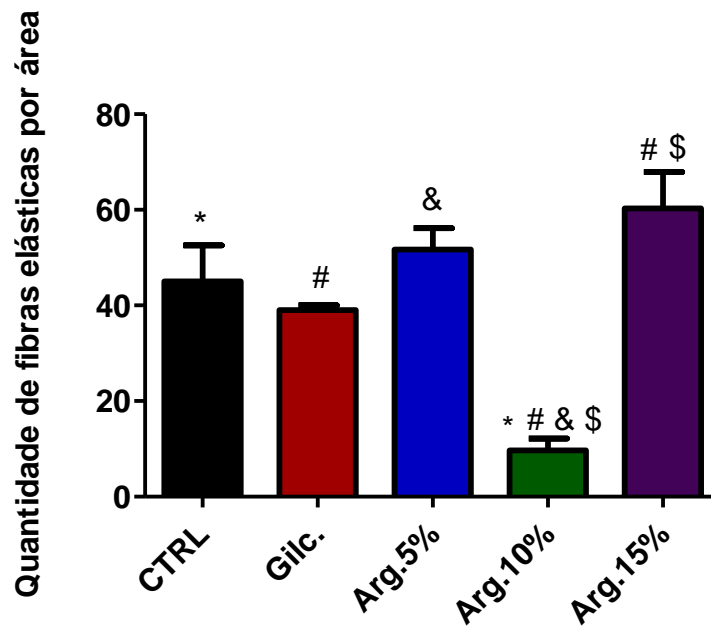


Figura 23. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas adultas.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL). *, #, & e \$, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

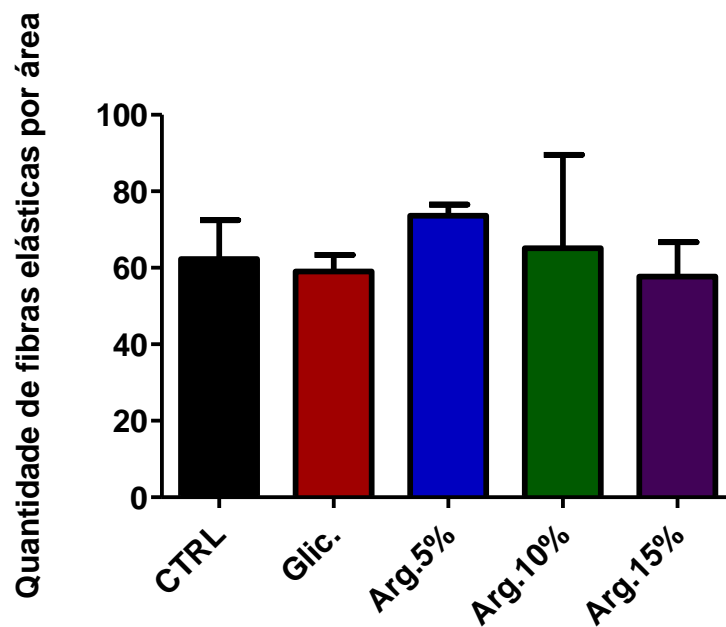


Figura 24. Quantificação de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas jovens.

Os animais foram tratados com glicerol (Glic.), dispersão de *L*-arginina a 5% em glicerol (Arg. 5%), dispersão de *L*-arginina a 10% em glicerol (Arg.10%), dispersão de *L*-arginina a 15% em glicerol (Arg. 15%) ou não receberam qualquer tipo de tratamento (CTRL); $n = 5$.

As figuras de 22 a 24 mostram a quantidade de fibras elásticas por área, na pele dos camundongos fêmeas. Na figura 22, é possível observar que no grupo das idosas fêmeas houve uma diferença significativa no número de fibras elásticas da pele de camundongos dos grupos CTRL e tratado com dispersão de *L*-arginina a 15%, figuras 25; entre os animais do grupo tratado somente com glicerol e os dos demais grupos tratados com dispersão de *L*-arginina a 5%, a 10% e a 15% e entre os animais dos grupos tratados com dispersão de *L*-arginina a 10% e a 15%. Na figura 23, pode-se observar que os animais do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10% apresentaram uma quantidade menor de fibras elásticas na pele quando comparados aos animais dos demais grupos. Além disso, ainda houve diferença entre os animais do grupo tratado com glicerol e os do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 15%. Por fim, na figura 24, observa-se que no grupo das jovens fêmeas não houve diferença entre o número de fibras elásticas da pele dos animais do grupo CTRL e os dos grupos tratados, figura 26.

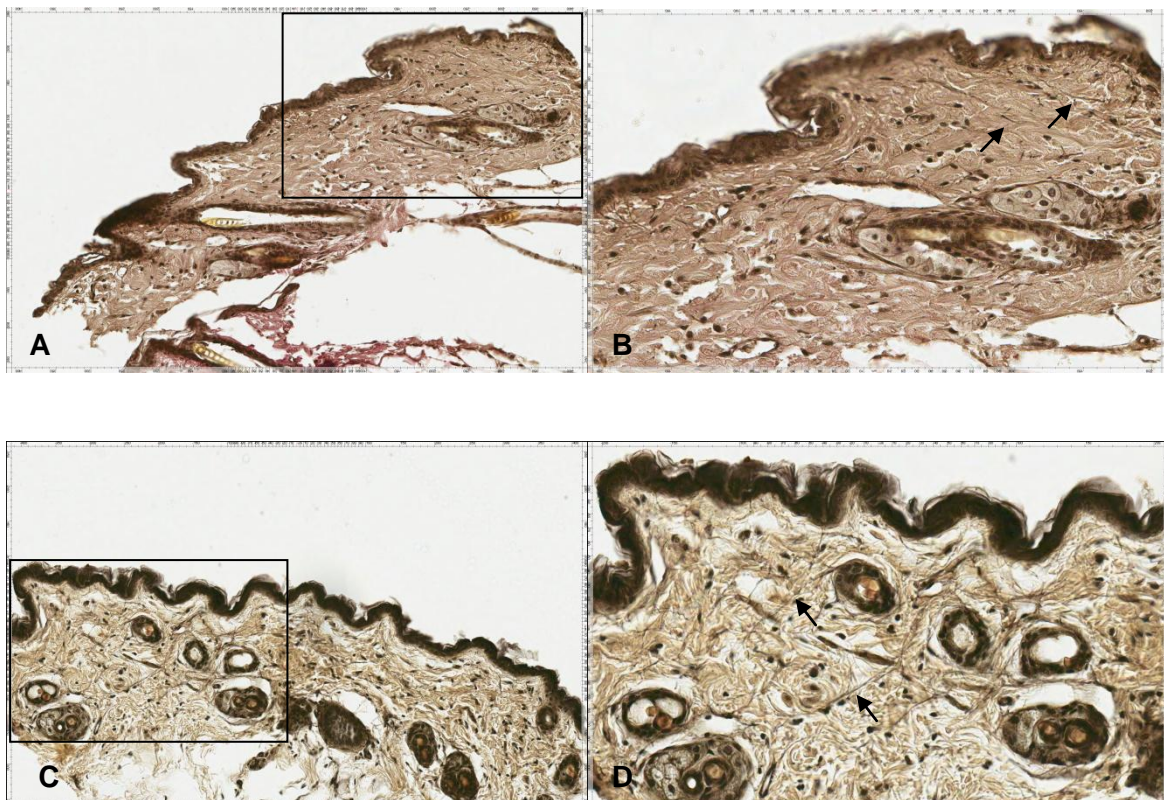


Figura 25. Análise de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas idosas.

Análise de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas idosas utilizando a coloração pelo método de Verhoeff. (A) grupo controle, aumento de 200x; (B) grupo controle, aumento de 400x, (C) grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 15%, aumento de 200x e (D) grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 15%, aumento de 400x.

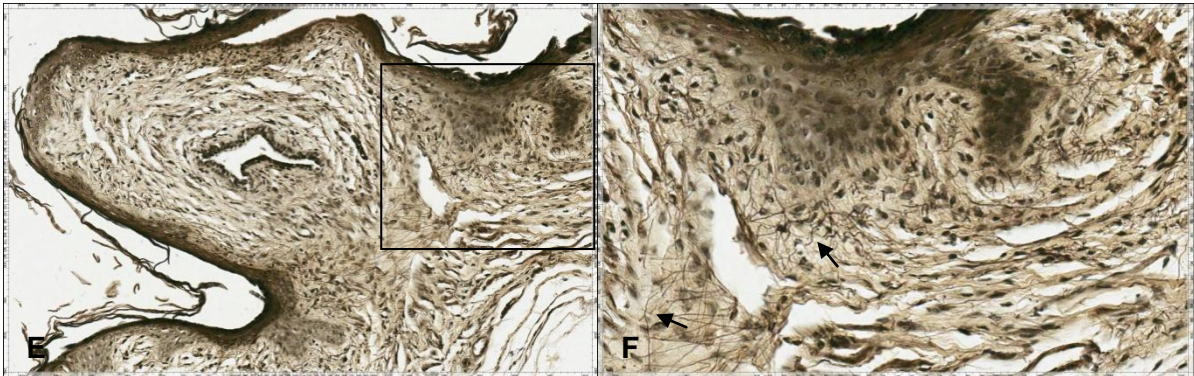


Figura 26. Análise de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas jovens.

Análise de fibras elásticas na pele de camundongos fêmeas jovens tratadas com dispersão de L-arginina a 10%. Coloração de Verhoeff. (E) Aumento de 200x e (F) aumento de 400x.

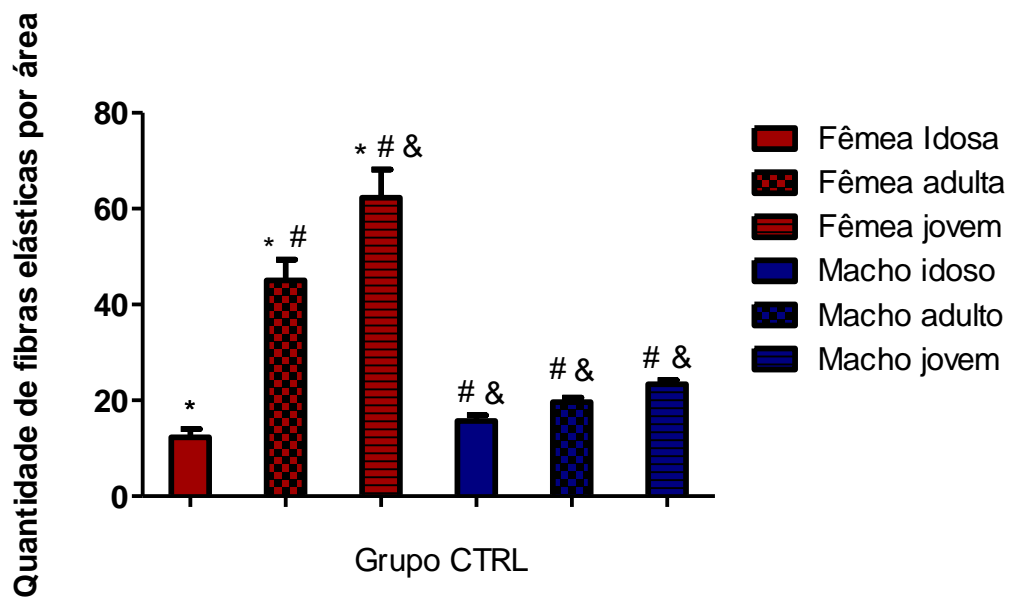


Figura 27. Comparação entre a quantidade de fibras elásticas na pele dos camundongos machos e fêmeas dos grupos controle.

Animais sem qualquer tipo de tratamento (CTRL). As fibras elásticas foram contadas a partir de um retículo quadriculado 0,1 x 0,1 mm/100 divisões, em três campos diferentes. *, # e &, diferença significativa considerada para $P < 0,05$; $n = 5$.

A figura 27 mostra a comparação da quantidade de fibras elásticas na pele dos camundongos dos grupos controles de machos e fêmeas. No grupo das fêmeas a quantidade de fibras elásticas diminui significativamente com o envelhecimento, ao

contrário dos machos, que apesar de terem menos fibras elásticas, mantêm uma quantidade relativamente uniforme em todas as idades.

4.2.3. Análise por imuno-histoquímica para detecção de iNOS.

Os fragmentos das peles dos camundongos foram processados para análise histológica por coloração imuno-histoquímica específica para detecção de iNOS. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 3 e 4, expressos em intensidade e distribuição da coloração específica para iNOS.

Tabela 3 - Avaliação por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS na pele de camundongos machos.

Grupo		Epitélio	Anexos cutâneos	Tecido conjuntivo	
Macho	Idoso	CTRL	-	+, focal	-
		Glicerol	-	+, focal	-
		Arg. 5%	-	-	-
		Arg.10%	-	-	-
		Arg.15%	+++ , uniforme	+++ , uniforme	+, uniforme
	Adulto	CTRL	-	-	-
		Glicerol	-	-	-
		Arg. 5%	-	-	-
		Arg.10%	-	-	-
		Arg.15%	-	+, difusa	-
	Jovem	CTRL	+, difusa	++, uniforme	+++ , uniforme
		Glicerol	+, difusa	+, difusa	+, uniforme
		Arg. 5%	+, difusa	+, difusa	+, difusa
		Arg.10%	+++ , uniforme	++, uniforme	++, uniforme
		Arg.15%	-	+, uniforme	-

A análise foi feita pela intensidade e distribuição da marcação para iNOS no epitélio, anexos cutâneos e no tecido conjuntivo. O resultado representa a média das análises de três observadores distintos, sendo duas patologistas. As intensidades das células positivas coradas foram pontuadas como: -, negativa; +, coloração de mais de 0% mas inferior a 30%; ++, coloração de mais de 30% mas inferior a 70%; +++, coloração de mais de 70%. A distribuição da coloração foi identificada como difusa, focal ou uniforme.

Nos resultados apresentados na tabela 3, pode-se observar que a pele dos animais do grupo de camundongos machos idosos tratados com dispersão de *L*-arginina a 15% foi a que apresentou uma coloração mais intensa para o marcador de iNOS quando comparada com a pele dos animais do grupo controle (CTRL) ou dos demais grupos. A pele dos adultos machos apresentou coloração negativa para iNOS praticamente em todas as estruturas observadas, sendo positiva somente para os anexos cutâneos dos animais tratados com dispersão de *L*-arginina a 15%. A análise da pele dos camundongos jovens indicou uma coloração específica para iNOS numa intensidade de mais de 30% na epiderme, no tecido conjuntivo e nos anexos cutâneos, exceto para os camundongos jovens tratados com dispersão de *L*-arginina a 15%, que só apresentaram marcação para iNOS nos anexos cutâneos. Os camundongos jovens tratados com dispersão de *L*-arginina a 10% foram os que apresentaram maior intensidade de coloração específica para iNOS na epiderme, figura 28.

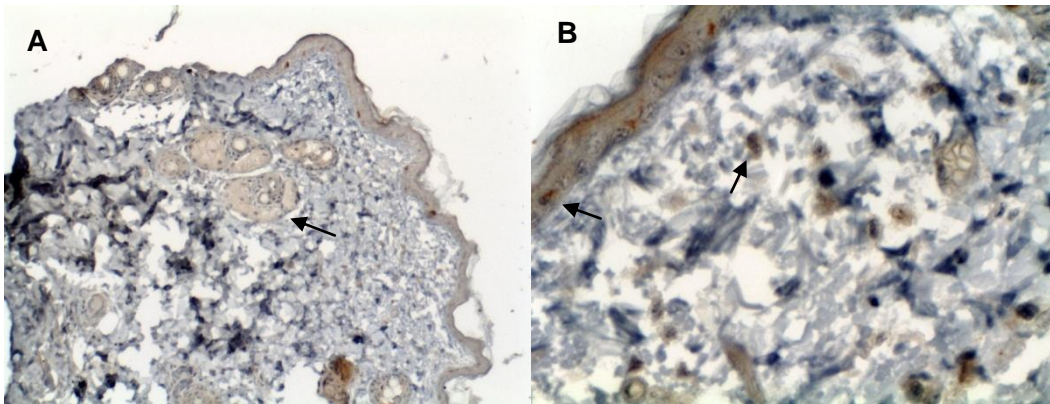


Figura 28. Análise de iNOS por coloração imuno-histoquímica na pele de camundongos machos.

Análise de iNOS por coloração imuno-histoquímica na pele de camundongos machos jovens tratados com dispersão de *L*-arginina a 10%. Há marcação positiva para iNOS nas células do epitélio, do tecido conjuntivo e nos anexos cutâneos. (A) Aumento de 100x e (B) aumento de 400x.

Tabela 4 - Avaliação por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS na pele de camundongos fêmeas.

Grupo		Epitélio	Anexos cutâneos	Tecido conjuntivo	
Fêmea	Idosa	CTRL	+, difusa	++, uniforme	++, difusa
		Glicerol	-	++, uniforme	-
		Arg. 5%	++, uniforme	++, uniforme	+, difusa
		Arg.10%	-	++, uniforme	-
		Arg.15%	-	++, uniforme	-
	Adulta	CTRL	-	-	-
		Glicerol	-	-	-
		Arg. 5%	*	*	*
		Arg.10%	++, uniforme	+, uniforme	+, difusa
		Arg.15%	++, uniforme	++, uniforme	+, difusa
	Jovem	CTRL	+, uniforme	++, uniforme	++, uniforme
		Glicerol	+, difusa	+, difusa	-
		Arg. 5%	-	-	-
		Arg.10%	+++ , uniforme	++, uniforme	+++ , uniforme
		Arg.15%	-	+, difusa	+, difusa

A análise foi feita pela intensidade e distribuição da marcação para iNOS no epitélio, anexos cutâneos e no tecido conjuntivo. O resultado representa a média das análises de três observadores distintos, sendo duas patologistas. As intensidades das células positivas coradas foram pontuadas como: -, negativa; +, coloração de mais de 0% mas inferior a 30%; ++, coloração de mais de 30% mas inferior a 70%; +++, coloração de mais de 70%; *, material insuficiente para análise. A distribuição da coloração foi identificada como difusa, focal ou uniforme.

Na tabela 4 observam-se os resultados obtidos para o grupo de camundongos fêmeas. A pele dos animais do grupo das fêmeas idosas apresentaram marcação positiva para iNOS, com coloração de intensidade maior que 30% nos anexos cutâneos, em todos tipos de tratamentos aplicados. Somente para os animais do grupo CTRL e do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 5%, houve uma discreta marcação positiva para iNOS na epiderme, figuras 29 a 31. No grupo dos animais adultos, somente as fêmeas que receberam tratamento com dispersão de *L*-arginina apresentaram coloração positiva para iNOS na pele. No grupo das jovens, as fêmeas que receberam tratamento com dispersão de *L*-arginina a 5% apresentaram coloração negativa em todas as áreas observadas.

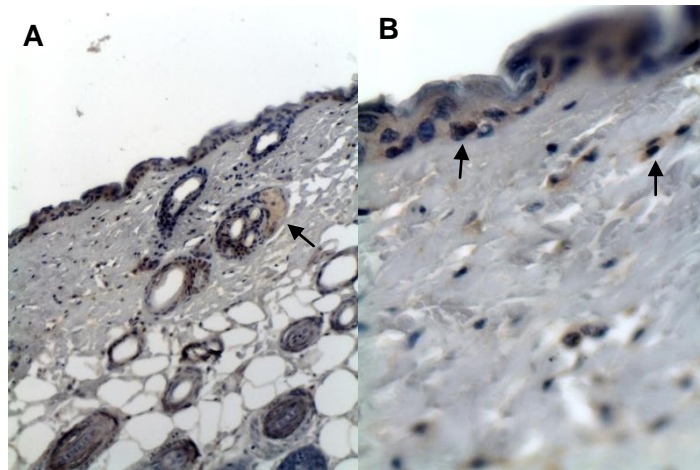


Figura 29. Análise da pele dos camundongos fêmeas por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS.

Análise de iNOS por coloração imuno-histoquímica na pele de camundongos fêmeas idosas do grupo controle. Há marcação positiva nas células do epitélio, do tecido conjuntivo e nos anexos cutâneos. (A) Aumento de 100x e (B) aumento de 400x.

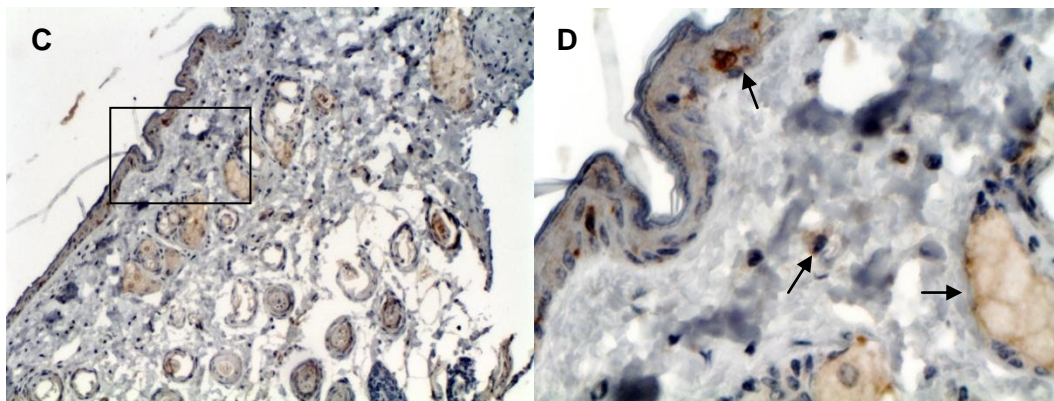


Figura 30. Análise da pele dos camundongos fêmeas por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS.

Análise de iNOS por coloração imuno-histoquímica na pele de camundongos fêmeas idosas tratadas com dispersão de *L*-arginina a 5%. Há marcação positiva nas células do epitélio, do tecido conjuntivo e nos anexos cutâneos. (C) Aumento de 100x e (D) aumento de 400x.

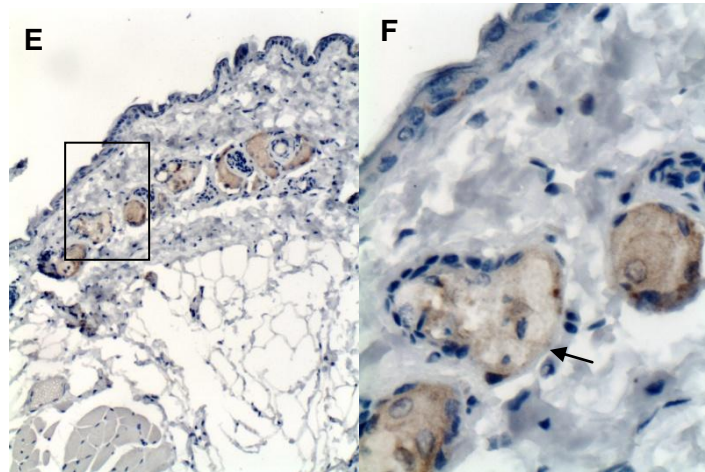


Figura 31. Análise da pele de camundongos fêmeas por coloração imuno-histoquímica para detecção de iNOS.

Análise de iNOS por coloração imuno-histoquímica na pele de camundongos fêmeas idosas tratadas com dispersão de *L*-arginina a 15%. Há marcação positiva apenas nos anexos cutâneos. (E) Aumento de 100x e (F) aumento de 400x.

4.3. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ÓLEO-ÁGUA DA *L*-ARGININA.

O coeficiente de partição óleo/água ($K_{O/A}$) da *L*-arginina foi determinado utilizando o sistema octanol-água. $K_{O/A}$ mede a lipofilia da substância em estudo e é definido como a razão da concentração da mesma, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol.

Após a dissolução da *L*-arginina na água, partição entre os dois solventes em equilíbrio e quantificação do aminoácido, os valores encontrados para $K_{O/A}$ e $\text{Log}(K_{O/A})$ foram:

$$K_{O/A} = 0,147 \pm 0,028$$

e

$$\text{Log}(K_{O/A}) = -0,83699 \pm 0,089467,$$

demonstrando uma característica de hidrofilia da *L*-arginina, que demonstrou um baixo valor negativo do Log de $K_{O/A}$.

4.4. AVALIAÇÃO DE RETENÇÃO, PENETRAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA.

A *L*-arginina aplicada sobre a pele de suínos foi submetida ao teste de avaliação da retenção, penetração e permeação cutânea, por utilização da células de Franz.

As figuras 32 a 34 mostram, respectivamente, a quantidade *L*-arginina que ficou retida no estrato córneo (EC), a quantidade *L*-arginina que penetrou todas as camadas da pele, epiderme e derme, e a quantidade *L*-arginina que atravessou todas as camadas da pele e atingiu o tampão receptor (TR), por variação da concentração de *L*-arginina aplicada.

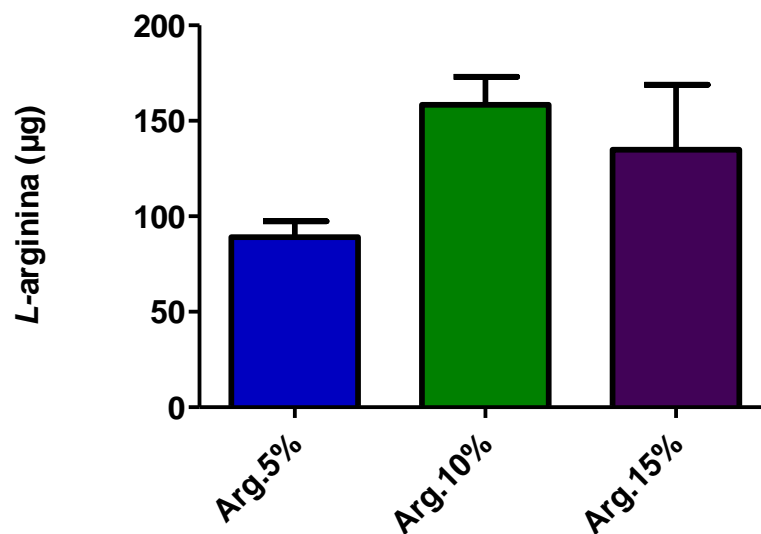


Figura 32. Avaliação da retenção cutânea de L-arginina.

As peles de orelhas suínas foram tratadas com 300 µL de dispersão de *L*-arginina nas concentrações de 5%, 10% e 15%. Após 12 horas de contato das dispersões com a pele suína, nas células de Franz, o excesso da dispersão foi retirado com um papel de filtro e a fita adesiva utilizada para o procedimento de *tape-stripping* foi processada para verificar a quantidade de *L*-arginina que permanecia no estrato córneo. Diferença significativa considerada para $P < 0,05$, $n=3$.

Os resultados do teste de retenção cutânea não apresentaram diferença significativa para as diferentes concentrações das dispersões de L-arginina utilizadas no ensaio.

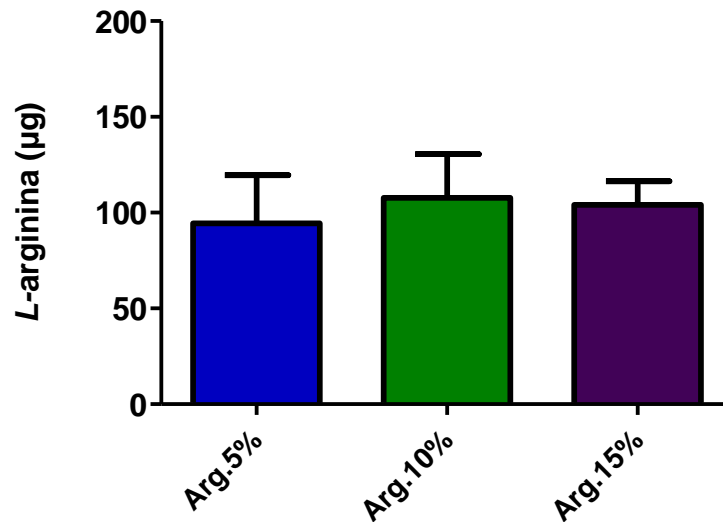


Figura 33. Avaliação da penetração da L-arginina na pele (epiderme e derme).

As peles de orelhas suínas foram tratadas com 300 µL de dispersão de L-arginina nas concentrações de 5%, 10% e 15%. Após 12 horas de contato das dispersões com a pele suína, nas células de Franz, da remoção do excesso da dispersão com auxílio de um papel de filtro, e do procedimento de tape-stripping, a pele foi processada para verificar a quantidade de L-arginina que havia penetrado, mas não permeado a pele. Diferença significativa considerada para $P < 0,05$, $n = 3$.

Pode-se observar pela figura 33 que as diferentes concentrações das dispersões de L-arginina utilizadas no ensaio não demonstraram resultados significativamente diferentes no teste de penetração cutânea.

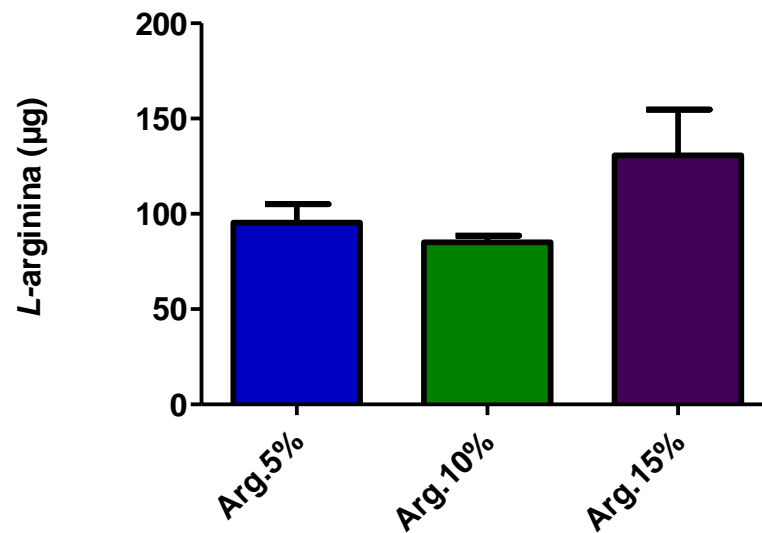


Figura 34. Avaliação da permeação cutânea da L-arginina.

As peles de orelhas suínas foram tratadas com 300 µL de dispersão de L-arginina nas concentrações de 5%, 10% e 15%. Após 12 horas de contato das dispersões com a pele suína nas células de Franz, a concentração de L-arginina capaz de atravessar todas as camadas da pele e atingir o tampão receptor (TR) foi determinada. Diferença significativa para $P < 0,05$, $n = 3$.

Para as diferentes concentrações de L-arginina (5%, 10% e 15%) aplicadas na pele de orelha suína, não houve diferença significativa na quantidade L-arginina que permeou para o tampão receptor (TR).

Os resultados de retenção, penetração e permeação cutânea obtidos para cada uma das concentrações das dispersões de L-arginina usadas nos ensaios foram comparadas entre si e estão apresentadas nas figuras 35 a 37.

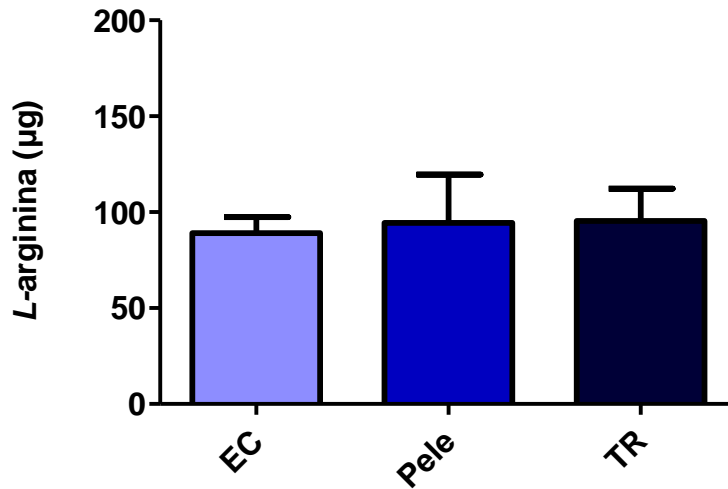


Figura 35. Avaliação da retenção, penetração e permeação cutânea da dispersão de *L*-arginina, na concentração de 5%.

As peles de orelhas suínas foram tratadas com 300 µL de dispersão de *L*-arginina na concentração de 5%. Após 12 horas de contato da dispersão com a pele suína nas células de Franz, a concentração de *L*-arginina (µg) foi determinada no estrato córneo (EC), na pele (epiderme e derme) e no tampão receptor (TR). Diferença significativa considerada para $P < 0,05$, $n = 3$.

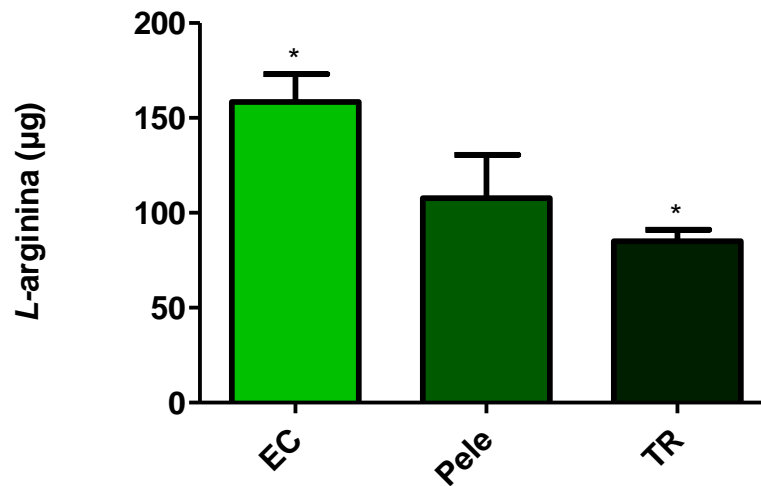


Figura 36. Avaliação da retenção, penetração e permeação cutânea da dispersão de *L*-arginina, na concentração de 10%.

As peles de orelhas suínas foram tratadas com 300 µL de dispersão de *L*-arginina na concentração de 10%. Após 12 horas de contato da dispersão com a pele suína nas células de Franz, a concentração de *L*-arginina (µg) foi determinada no estrato córneo (EC), na pele (epiderme e derme) e no tampão receptor (TR). *, diferença significativa considerada para $P < 0,05$, $n = 3$.

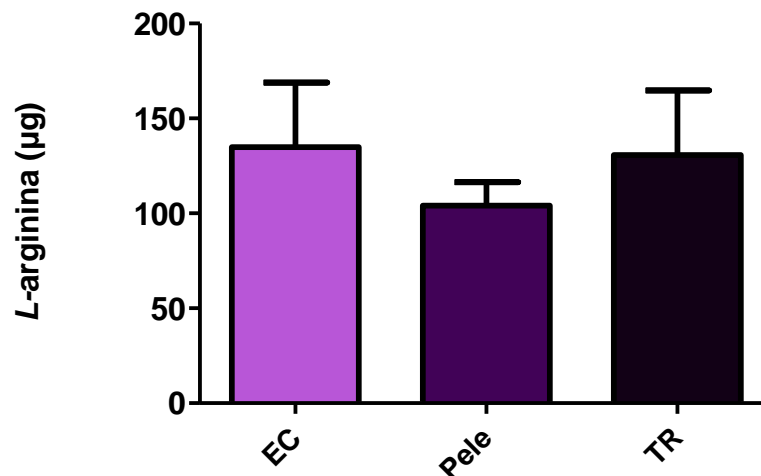


Figura 37. Avaliação da retenção, penetração e permeação cutânea da dispersão de *L*-arginina, na concentração de 15%.

As peles de orelhas suínas foram tratadas com 300 µL de dispersão de *L*-arginina na concentração de 15%. Após 12 horas de contato da dispersão com a pele suína nas células de Franz, a concentração de *L*-arginina (µg) foi determinada no estrato córneo (EC), na pele (epiderme e derme) e no tampão receptor (TR). Diferença significativa considerada para $P < 0,05$, $n = 3$.

As figuras 35 a 37, mostram a quantidade *L*-arginina que ficou retida no estrato córneo (EC), a quantidade *L*-arginina que penetrou todas as camadas da pele, epiderme e derme, e a quantidade *L*-arginina que atravessou todas as camadas da pele e atingiu o tampão receptor (TR) para cada concentração da dispersão de *L*-arginina aplicada na pele. Para as aplicações de 5% e 15% de *L*-arginina, não houve diferença significativa na quantidade que permaneceu no EC, que penetrou na pele e que permeou para o TR. Porém, para a aplicação de 10% de *L*-arginina, houve diferença significativa na quantidade que permaneceu no EC e na quantidade que permeou para o TR, sendo maior a quantidade que permaneceu no EC.

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA METALOPROTEINASE.

A atividade das metaloproteínases da pele dos camundongos foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina, assim como o perfil

proteico destas mesmas amostras foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições dissociantes.

As tabelas 5 e 6 mostram a atividade proteolítica das metaloproteínases presentes na pele dos camundongos, após tratamento das amostras para eliminação de outras proteases. As amostras que apresentaram atividade proteolítica foram as do grupo controle, sem tratamento algum, dos idosos machos, do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10% dos adultos machos e do grupo tratado com glicerol das idosas fêmeas. As bandas correspondentes a cada proteína que apresentou atividade proteolítica estão mostradas nas figuras 39 a 40. A coluna 2 corresponde ao soro fetal bovino (SFB), que foi aplicado no gel de poliacrilamida, após tratamento idêntico ao das amostras, e usado como controle positivo.

As massas moleculares correspondentes a cada banda de proteína do zimograma foram calculadas de acordo com a curva padrão obtida pela aplicação do marcador de peso molecular de proteínas BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (10 a 190 kDa), figura 38.

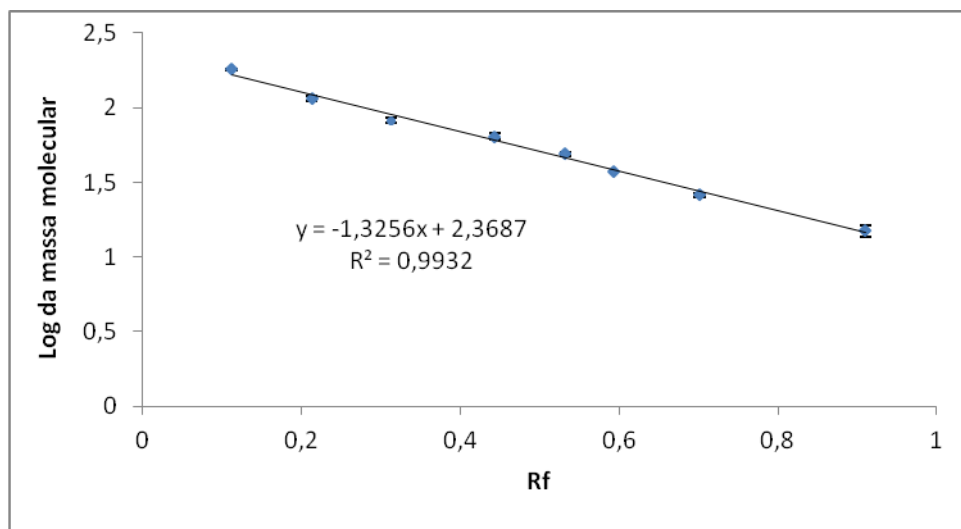


Figura 38. Curva padrão para determinação da massa molecular relativa.

Os padrões utilizados na construção da curva de calibração para determinação da massa molecular relativa das amostras foram os do marcador de massa molecular de proteínas na Invitrogen (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder). A melhor reta entre os pontos foi: $\log MM = -1,3256 \times Rf + 2,3687$ ($R = 0,9966$).

Tabela 5 - Atividade proteolítica em gel de eletroforese (acrilamida/bisacrilamida 10% e gelatina 1%) da pele de camundongos machos.

Grupo		Atividade proteolítica	Massa molecular calculada (kDa)	Provável MMP correspondente													
Macho	Idoso	CTRL	Sim	81	pró-MMP-8												
				57	pró-MMP-3												
				26	pró-MMP-7												
				16	MMP-7 ativa ou MMP-26 ativa												
				-													
	Adulto	Glicerol	Não	-													
						Arginina 5%	Não	-									
										Arginina 10%	Não	-					
														Arginina 15%	Não	-	
		Glicerol	Não	-													
						Arginina 5%	Não	-									
										Arginina 10%	Sim	28	pró-MMP-7				
														Arginina 15%	Não	-	
		Glicerol	Não	-													
						Arginina 5%	-	-									
										Arginina 10%	Não	-					
														Arginina 15%	-	-	

As peles dos camundongos machos foram processadas e submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com 1% de gelatina. As amostras que apresentaram atividade proteolítica tiveram a massa molecular destas bandas calculadas pela curva padrão feita com o marcador de proteínas (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder).

Tabela 6 - Atividade proteolítica em gel de eletroforese (acrilamida/bisacrilamida 10% e gelatina 1%) da pele de camundongos fêmeas.

Grupo		Atividade proteolítica	Massa molecular calculada (kDa)	Provável MMP correspondente	
Fêmea	Idosa	Glicerol	90	pró-MMP-9	
			29	MMP-7 ativa	
			20	pró-MMP-7	
		Arginina 5%	Não	-	
	Arginina 10%	Não	-		
	Arginina 15%	Não	-		
	Adulta	CTRL	Não	-	
		Glicerol	Não	-	
		Arginina 5%	Não	-	
		Arginina 10%	Não	-	
		Arginina 15%	Não	-	
	Jovem	CTRL	Não	-	
		Glicerol	Não	-	
		Arginina 5%	Não	-	
		Arginina 10%	Não	-	
		Arginina 15%	Não	-	

As peles dos camundongos fêmeas foram processadas e submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com 1% de gelatina. As amostras que apresentaram atividade proteolítica tiveram a massa molecular destas bandas calculadas pela curva padrão feita com o marcador de proteínas (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder).

As bandas com atividade protease encontradas na análise do SFB, coluna 2 das figuras 39 a 40, correspondem a proteínas de massas moleculares de 95 ± 3 kDa e 64 ± 2 kDa, que equivalem à MMP-9 e à MMP-2. Possivelmente a banda correspondente à massa molecular de 64 ± 2 kDa corresponde à pró-MMP-2. No zimograma de atividade proteolítica das amostras de pele dos animais do grupo dos machos idosos controle (figura 39, coluna 3) foram encontradas as bandas de atividade correspondentes às massas moleculares de 81 kDa, a qual pode ser correspondente à pró-MMP-8; 57 kDa, que sugere a presença de pró-MMP-3 na amostra; 26 kDa que sugere a presença de pró-MMP-7 na amostra e 16 kDa, que corresponde a uma massa molecular próxima à da MMP-7 ou da MMP-26. As bandas de atividade proteolíticas encontradas no gel de análise das peles dos animais do grupo das fêmeas idosas tratadas com glicerol (figura 40, coluna 3)

corresponderam a massas moleculares de 90 kDa, sugerindo a expressão de pró-MMP-9 na amostra; 29 kDa e 20 kDa, ambas próximas à massa molecular da MMP-7, na forma ativa e da pró-enzima, respectivamente.

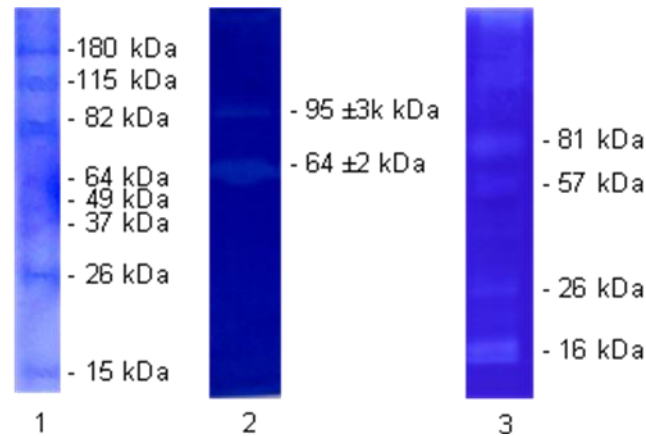


Figura 39. Avaliação da atividade proteolítica por zimografia da pele de camundongos machos idosos.

As peles dos camundongos foram processadas e submetidas ao gel de eletroforese. Coluna 1: marcador de proteínas (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder), coluna 2: soro fetal bovino (SFB) e coluna 3: amostra de pele de camundongo macho idoso controle.

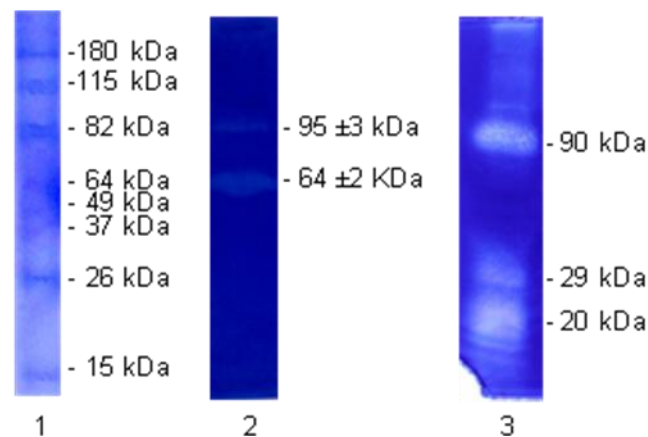


Figura 40. Avaliação da atividade proteolítica por zimografia da pele de camundongos fêmeas idosas.

As peles dos camundongos foram processadas e submetidas ao gel de eletroforese. Coluna 1: marcador de proteínas (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder), coluna 2: soro fetal bovino (SFB) e coluna 3: amostra de pele de camundongo fêmea idosa tratada com glicerol.

5. DISCUSSÃO

A expectativa de vida está aumentando continuamente. Segundo a Organização mundial de Saúde, entre 1950 e 2025 a população brasileira acima de 60 anos deverá crescer 16 vezes, enquanto a estimativa de crescimento da população geral é de cinco vezes (62). Em muitos países está ocorrendo uma transição demográfica, envolvendo envelhecimento da população e redução da natalidade. Os avanços na medicina contribuíram significativamente para esse aumento na expectativa de vida, especialmente durante o século XX. É estimado que, nos próximos 45 anos, um terço das mulheres estará na menopausa, e, com isso, a medicina do antienvelhecimento ganhará ainda mais importância (10).

Além disso, segundo Son e colaboradores (63), com o aumento da expectativa de vida, as mulheres da modernidade poderão passar mais de um terço da vida no período da pós-menopausa. Durante esse período, algumas alterações hormonais, como perda na produção de estrogênio, aceleram as mudanças observadas na pele. A derme e a epiderme tornam-se mais finas, perdem elasticidade e resistência à tração. A deficiência de estrogênio está relacionada às alterações nas fibras de colágeno e nas fibras elásticas, resultando em enrugamento e aumento da flacidez após a menopausa. Tem sido demonstrado que a significativa redução de colágeno se inicia na menopausa e essa perda torna-se mais rápida durante o período inicial da pós-menopausa, sendo que aproximadamente 30% do colágeno são perdidos nos primeiros cinco anos deste período. A taxa média da perda de colágeno é de 2,1% por ano pós-menopausa (63).

Em uma sociedade em envelhecimento, a proporção de pessoas idosas, com mais de 65 anos, compreende mais que 7% da população em geral (7).

O envelhecimento é um processo natural e inevitável da vida, mas, com o aumento da população idosa, a preocupação social com o esse processo tem aumentado muito. E é na pele que os efeitos do envelhecimento são mais aparentes, mais que em qualquer outro órgão (7).

Por esta razão, juntamente com essas novas perspectivas de vida, as investigações para manter a aparência da pele jovem aumentaram nas últimas

décadas. As rugas e a flacidez da pele já são consideradas como um problema dermatológico que pode ser combatido, e não mais como um resultado inevitável do envelhecimento (10).

Nos últimos 40 anos, muitos progressos aconteceram no campo das pesquisas sobre o envelhecimento, facilitando a compreensão dos mecanismos moleculares deste processo (64).

E como a pele tem uma função fisiológica de barreira para proteção contra danos ambientais, e ainda funciona como uma interface social entre a sociedade e o indivíduo, os interesses e esforços para prevenir o envelhecimento da pele estão crescendo rapidamente no campo da dermatologia e das indústrias de cosméticos (7). Por estas razões, há um grande interesse na descoberta de novas substâncias e métodos para o tratamento do envelhecimento.

Uma das medidas para prevenir e tratar o envelhecimento é aumentar a síntese de colágeno e elastina dérmicos pelo tratamento clínico tópico com dermocosméticos (64). Várias substâncias têm sido testadas para avaliar sua contribuição em retardar o processo do envelhecimento, pelos mais diversos mecanismos, como pelo sequestro de espécies reativas de oxigênio e restabelecimento do equilíbrio redox (65), pela inibição da expressão ou da atividade das metaloproteinases (22), pelo aumento da expressão ou manutenção das atividades dos TIMPs (66), pela inibição da elastose (14), ou pela simples proteção contra a radiação UV, que promove a formação de espécies reativas de oxigênio que desencadeiam vários desses processos responsáveis pelo envelhecimento (67).

Dentre os tratamentos cosméticos mais utilizados contra o envelhecimento hoje em dia está o *peeling* químico para revitalização da pele (10), para o qual uma das opções terapêuticas é o ácido retinóico, ou tretinoína. Este previne a perda de colágeno, pela inibição da MMP-2, e estimula a formação de novo colágeno. Os retinóides podem, ainda, influenciar o reparo do DNA e a expressão gênica para aumentar a produção de matriz extracelular. Em experimentos realizados em ratos, observou-se uma diminuição nas rugas após tratamento com 0,05% de ácido retinóico por duas semanas (22).

Foi demonstrado, também, que o tratamento com a coenzima Q₁₀ melhora a produção de colágeno tipo IV e a expressão de elastina em fibroblastos (68).

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa e de nossos colaboradores, foi observado que camundongos que tiveram a suplementação da dieta com *L*-arginina, por administração oral, ou receberam arginina por administração tópica, durante um processo de cicatrização de ferida operatória, apresentaram uma cicatrização precoce quando comparados com os animais do grupo controle. Além disso, foi observada, na pele dos animais tratados, uma maior produção de fibras colágenas, que também se apresentaram mais organizadas e maduras quando comparadas com a pele dos animais do grupo controle (resultados não apresentados). Como já mencionado, Soneja e colaboradores (2006) também encontraram um aumento da força tênsil da cicatriz e da deposição de colágeno no processo de cicatrização, em comparação com o controle (40). Esses resultados sugeriram um efeito positivo da arginina na produção de colágeno e instigaram a investigação do efeito deste aminoácido na pele íntegra, para avaliar a sua influência na elasticidade da pele e sua possível utilização como cosmético.

Como já mencionado, o envelhecimento é caracterizado por contínuas alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo e consequente senescência e morte celular programada (apoptose) (64). Tanto no envelhecimento intrínseco quanto no envelhecimento extrínseco, a pele é marcada por alterações nas funções normais das fibras elásticas, o que pode explicar algumas das manifestações do envelhecimento cutâneo como as rugas, a flacidez da pele e a perda da resistência e elasticidade (29).

As fibras colágenas, produzidas pelos fibroblastos, estão dispostas paralelamente à superfície da pele, o que garante uma elevada resistência à tração, e impede que ela seja rasgada por distensão. A elastina, por sua vez, garante resiliência e elasticidade à pele (69).

O envelhecimento altera o metabolismo dos fibroblastos reduzindo sua vida útil, bem como a sua capacidade de sintetizar colágeno. Durante o envelhecimento, a redução proporcional dos proteoglicanos de cadeia longa, juntamente com o aumento simultâneo das pequenas moléculas de proteoglicanos, intensifica a síntese de fibras colágenas e o seu alargamento, o que diminui a elasticidade da pele. A derme se atrofia, devido à redução de colágeno e alguns proteoglicanos, e o

mesmo acontece com o tecido adiposo da hipoderme. O colágeno tipo IV, que forma uma rede densa ao nível das junções dermo-epidérmicas, pode sofrer uma diminuição, enfraquecer essa junção e comprometer a estabilidade mecânica da pele. O sulfato de condroitina, que consolida a ligação das fibras colágenas e contribui com a manutenção da hidratação cutânea, também diminui durante o envelhecimento (70).

No presente trabalho, foram realizados experimentos *in vivo* para avaliar a influência da *L*-arginina na resistência da pele à tração. Após a eutanásia, as peles dos camundongos tratados foram submetidas à distensão, para avaliação da força de tração máxima suportada pelo tecido antes da sua ruptura, e os resultados estão apresentados nas figuras 10 a 15.

Nos camundongos machos idosos, foi observado que as peles submetidas ao tratamento com dispersão de *L*-arginina, durante 15 dias, suportaram uma maior força de tração até a ruptura, quando comparadas às peles dos animais tratados somente com glicerina e às peles dos animais do grupo controle (figura 10). No grupo dos adultos machos não houve diferença significativa entre os grupos tratados com o grupo controle (figura 11). Já no grupo dos jovens machos, as peles dos camundongos tratados com glicerina foram menos resistentes que a pele dos camundongos do grupo controle e dos grupos tratados com dispersões de *L*-arginina. Entre os grupos tratados, houve ainda diferença significativa entre as peles tratadas com dispersão de *L*-arginina 5% e *L*-arginina 15% (figura 12).

Como a pele de idosos naturalmente apresenta perda de colágeno e fibras elásticas, o que deixa a pele mais fina e flácida, era de se esperar uma menor resistência à força tênsil. Em contrapartida, os grupos tratados com dispersões de *L*-arginina apresentaram maior resistência à força tênsil (figura 10). Nos grupos dos animais jovens adultos não houve nenhuma diferença significativa nos resultados obtidos para o grupo controle e os grupos tratados com *L*-arginina, isso pode ser devido ao fato de que as fibras colágenas inatas permanecem intactas nesses animais, garantindo resistência à tração. No entanto, nos jovens, o grupo tratado somente com glicerina teve menor resistência à tração quando comparado aos grupos tratados com dispersões de *L*-arginina na concentração de 10% e 15% (figura 12). Este foi um resultado inesperado, visto que a glicerina é considerada

capaz de melhorar a hidratação, a elasticidade e a função de barreira da pele (69) e vem sendo usada há milênios em formulações cosméticas para pele.

Como mencionado anteriormente, *L*-arginina é metabolizada no ciclo da ureia, dando origem a ornitina, que é o *link* para a produção de prolina, que, por sua vez, é utilizada pelos fibroblastos para síntese de colágeno (39). Isto pode explicar a elasticidade aumentada na pele dos camundongos idosos tratados com o aminoácido.

Nas fêmeas idosas foi observado o mesmo aumento de resistência da pele à força de tração quando se administrava topicamente as dispersões de *L*-arginina nos camundongos (figura 13). Nas fêmeas adultas, diferente do ocorrido com os machos, houve um aumento significativo na resistência da pele à força de tração nos animais do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10%, quando comparados aos animais do grupo controle (figura 14). Essa diferença de comportamento entre os animais dos diferentes gêneros pode ter sua explicação na perda de colágeno que tem seu início no fim do período fértil das fêmeas. Os efeitos relacionados à deficiência de estrogênio incluem atrofia, diminuição de colágeno e conteúdo de água, diminuição das secreções sebáceas, perda da elasticidade da pele e manifestações de hiperandrogenismo (72). Em ratos, a ooforectomia, por si só, é capaz de acelerar o envelhecimento da pele e aumentar sua sensibilidade à radiação ultravioleta. Dessa forma, a deficiência de estrogênio pode ser responsável pelo envelhecimento da pele no início do período infértil (69). No grupo dos camundongos jovens fêmeas, todos os animais tratados com dispersões de *L*-arginina apresentaram maior resistência da pele à força tênsil, sendo esta diferença maior entre os animais do grupo controle e os animais do grupo tratado com dispersões de *L*-arginina a 5% e 10%. Também houve diferença entre os animais do grupo tratado só com glicerina e os animais do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina 5%, sendo que as peles dos animais do grupo tratado com a menor concentração de *L*-arginina, 5%, foram as que apresentaram maior a resistência à tração (figura 15). Nos jovens, como as fibras colágenas ainda estão íntegras e exercendo sua função normal, o tratamento com *L*-arginina parece complementar essa resistência à força tênsil.

O colágeno é a proteína mais abundante, em peso, nos animais, correspondendo a 30% do total de proteínas nos mamíferos. É a principal proteína do tecido conjuntivo, tendões, ligamentos e córnea, além de formar a matriz dos ossos e dentes (15). O colágeno tipo I é o principal componente da matriz extracelular e a proteína estrutural mais abundante na pele. No envelhecimento da pele uma característica marcante é a fragmentação desse colágeno fibrilar, o que prejudica as propriedades mecânicas da pele e as funções das células da derme. Clinicamente, essa deficiência se manifesta em cicatrização tardia, propensão à contusão, pele fina, dentre outras (20).

Na pele jovem as fibras colágenas são mais abundantes e bem organizadas, são finas, onduladas, com unidades fibrilares uniformes. Na pele envelhecida as fibras colágenas são fragmentadas e desorganizadas, e são espessas, o que indica uma degradação parcial do colágeno. Esse colágeno envelhecido resulta das progressivas ligações cruzadas entre si (73). Análises bioquímicas quantitativas revelaram que a quantidade de colágeno fragmentado é 4,3 vezes maior nos idosos, com 80 anos de idade, que nos jovens, com 21 a 30 anos de idade (20). As alterações hormonais que acontecem no envelhecimento também influenciam as mudanças observadas nas fibras colágenas, principalmente nas mulheres (69).

Nas análises das fibras colágenas, a partir dos cortes histológicos das peles dos camundongos corados com Tricômio de Masson, foi possível observar que o grupo controle (CTRL) dos animais machos apresentava mais fibras colágenas na pele do que os animais do grupo CTRL das fêmeas, isso para quase todas as faixas etárias, exceto para os jovens, que apresentaram alta intensidade de coloração para fibras colágenas nas lâminas de pele de machos e fêmeas. Essa diferença observada entre machos e fêmeas pode ser explicada pela deficiência característica de estrogênio na fase final da idade fértil.

Ainda no grupo dos idosos machos, foi observado que a pele dos camundongos tratados com dispersões de *L*-arginina apresentou uma menor quantidade de fibras colágenas quando comparadas com a pele dos animais do grupo CTRL. Segundo Lin e seus colaboradores (74), alguns estudos mostraram que o NO induz tanto a expressão de MMP-1 quanto a ativação de enzimas em culturas de condrócitos. Além disso, inibidores de NOS diminuem a atividade das

colagenases, reduzindo a destruição de cartilagens em modelos caninos de artrite (74). Como o NO pode ser produzido a partir da *L*-arginina, o tratamento da pele com dispersões de *L*-arginina pode ter induzido uma maior produção de NO, o que induziria a expressão de MMP-1, e explicaria a menor quantidade de fibras colágenas nos grupos tratados, uma vez que os animais do grupo controle apresentavam altas concentrações das fibras colágenas.

Choe e colaboradores (67) avaliaram o efeito de NO na produção de MMP-1 e MMP-2 em fibroblastos humanos tratados com um doador de NO, para mimetizar os efeitos do NO na expressão de MMP. Os autores encontraram que o doador de NO usado nos ensaios aumentou a produção de MMP-2 em 243% com relação aos fibroblastos não tratados. A secreção de MMP-1 também aumentou, mas em menor grau que a MMP-2. Para avaliar a hipótese de que a produção de MMP nas células irradiadas com UV não seria mediada por NO, os autores avaliaram também o efeito combinado do tratamento das células com o doador de NO e com a radiação UV. Os resultados mostraram que o efeito da irradiação das células com UV e do tratamento com o doador de NO na produção de MMP-1 pelos fibroblastos não foi cumulativo, e que a radiação UV sozinha promovia a produção de MMP-1 num nível próximo ao máximo. Por outro lado, os resultados desse trabalho sugeriram que MMP-2 parecia ser influenciado por ambos os tratamentos, a irradiação com UV e o doador de NO ao mesmo tempo. Além disso, foi demonstrado, pelo tratamento dos fibroblastos com um análogo do GMP cíclico, que o aumento da produção de MMP-1 e MMP-2 pelo doador de NO usado no estudo não foi resultado do efeito tóxico deste doador de NO às células, mas foi mediado por NO, ou por metabólitos relacionados a este, e que o NO e o GMP cíclico possivelmente medeiam o aumento da produção de MMP induzida por UV. Avaliando, por fim, a ação de inibidores de NOS na produção de MMP, os autores concluíram que seus resultados sugeriam que NO afeta a produção de MMP-1 e MMP-2 através da via do GMP cíclico, e é um importante sinal mediador na regulação da produção de MMP por fibroblastos irradiados por UV (67).

Os resultados obtidos quando a pele dos camundongos foram submetidas à coloração por imuno-histoquímica específica para iNOS (tabelas 3 e 4) concordam com esta hipótese, uma vez que os animais idosos machos do grupo tratado com

dispersão de L-arginina a 15%, cujas análises histológicas da pele apresentaram menor intensidade de coloração para fibras colágenas, foram os que apresentaram maior marcação para iNOS no epitélio. O mesmo ocorreu com os animais jovens machos, cujas análises histológicas das peles apresentaram intensidade de coloração para colágeno um pouco menor que a dos animais em outras faixas etárias, mas foram os que na análise imuno-histoquímica apresentaram maior marcação específica para iNOS. Ainda, dentre os animais jovens, os grupos tratados com glicerol e dispersão de L-arginina a 15% apresentaram uma maior quantidade de fibras colágenas. Uma outra hipótese para explicar este fenômeno seria a metabolização da arginina, dando origem a ornitina e glutamina, que por sua vez podem originar a prolina, que faz parte da molécula de pró-colágeno, precursor do colágeno (46-47).

Como a L-arginina é, ao mesmo tempo, substrato para a produção de NO, que induz a produção de MMP, e fornece substrato para a síntese de colágeno, via produção de prolina, isto torna a compreensão de seu efeito sobre a melhora da elasticidade da pele mais complexa. O efeito benéfico da arginina na produção de colágeno pode ser similar ao que ocorre com a suplementação de arginina nos processos de cicatrização de feridas em camundongos diabéticos. O fato dos animais com diabetes exibirem uma deficiência de NO na região das feridas favorece a atuação da arginina como promotor da cicatrização em modelos de diabetes (40). Já nos animais saudáveis, não diabéticos, em que os níveis de NO em ambientes de feridas é normal, esse efeito benéfico da arginina no processo de cicatrização de feridas não é tão pronunciado.

De modo diferente ao observado nos camundongos machos, no grupo das fêmeas idosas, os animais do grupo tratado com glicerol e dispersão de L-arginina a 15% apresentou maior quantidade de fibras colágenas. Nas fêmeas, as alterações de hormônios no fim da idade fértil podem influenciar o decréscimo da quantidade de fibras colágenas e as dispersões de L-arginina podem ter contribuído para a síntese de colágeno pelo fornecimento de prolina. No grupo das fêmeas jovens, como era de se esperar, o grupo CTRL já apresentou maior quantidade de fibras colágenas que o grupo das idosas. Nesse grupo, as fêmeas jovens tratadas com glicerol e dispersão de L-arginina a 10% apresentaram uma menor quantidade de fibras colágenas.

Provavelmente essa quantidade de *L*-arginina já produz muito NO que pode estar induzindo a expressão de colagenases. Mais uma vez os resultados concordam com a imuno-histoquímica específica para detecção de iNOS, em que houve intensa marcação de iNOS para o grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10%, tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo.

Um efeito comum nos animais machos e fêmeas jovens tratados com dispersão de *L*-arginina a 15% foi que estes não exibiram marcação de iNOS no epitélio ou apresentaram muito pouca marcação de iNOS no tecido conjuntivo, enquanto apresentaram altas concentrações de colágeno em todos os grupos dos diferentes tratamentos.

O óxido nítrico é uma molécula mensageira que desempenha um papel crítico na circulação, diminuindo o tônus vascular, ativação de plaquetas e leucócitos, proliferação de células do músculo liso, deposição da matriz extracelular e morte das células endoteliais (75). O NO é endogenamente gerado a partir da *L*-arginina pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). No tecido humano três isoformas da NOS são expressas, duas formas constitutivas, NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS), e uma forma induzível (iNOS). A iNOS medeia eventos citotóxicos e eventos citostáticos no sistema imune, com propriedades antibacterianas, antiparasitárias e antitumoral (43).

Recentemente foi observado que o NO desempenha um papel importante no processo de cicatrização de feridas, por regular o catabolismo de colágeno. Além disso, foi observado que os fibroblastos humanos dérmicos expressam eNOS e iNOS, que podem ser importantes durante o estágio do processo inflamatório, ou depois, na fase de proliferação e remodelação do tecido, após a lesão. Embora vários estudos indiquem a inibição da síntese de colágeno por NO em vários tipos celulares, como arteríola, músculo liso vascular e células mesoteliais, outros estudos mostram que o NO induz a síntese de colágeno nos fibroblastos da lâmina própria do intestino delgado e na reepitelização da pele normal nos processos de cicatrização (43).

A análise de iNOS por imuno-histoquímica na pele dos camundongos do estudo demonstrou, no grupo de animais idosos machos, que o grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 15% apresentou coloração positiva para iNOS para mais

de 70% das células da epiderme, anexos cutâneos e tecido conjuntivo (tabela 3). De acordo com os resultados de Durante e seus colaboradores (75), a remoção de *L*-arginina pela arginase inibe a expressão de iNOS através da repressão da tradução, bem como diminui a estabilidade da proteína iNOS. Além disso, a arginase pode inibir a produção de NO mediada por iNOS através da geração de ureia. Assim, os autores sugerem que a arginase pode influenciar negativamente na produção de NO (75). Dessa forma, a *L*-arginina aplicada na pele dos camundongos pode estar aumentando a expressão de iNOS, mas esta também pode ser resultado de algum processo inflamatório instalado como consequência do envelhecimento extrínseco.

Nos adultos machos (tabela 3), somente os anexos cutâneos apresentaram coloração positiva para iNOS. De uma forma geral, nas análises da pele por imunohistoquímica, quando alguma das camadas da pele eram coradas para iNOS, os anexos cutâneos eram sempre corados. Nos jovens, todos os grupos de animais apresentaram coloração positiva para iNOS, exceto no grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 15%, com intensidade maior no tecido conjuntivo dos camundongos do grupo controle e no epitélio dos camundongos tratados com *L*-arginina a 10%. O próprio processo da síntese de colágeno, que é mais evidenciado em jovens e regulado por NO, corrobora com essa maior quantidade de iNOS no grupo jovem.

Nas fêmeas idosas, mais de 30% e menos de 70% das células dos anexos cutâneos foram coradas, tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados. No entanto, na epiderme e no tecido conjuntivo, as células só foram coradas no grupo controle e no grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 5%. Nas adultas, os grupos tratados com dispersão de *L*-arginina a 10 e a 15%, tiveram mais de 30% e menos de 70% das células da epiderme coradas para iNOS e menos de 30% das células do tecido conjuntivo coradas (tabela 4).

A atividade antagonista das citocinas pró-inflamatórias contra TGF- β desempenham uma função essencial na manutenção da homeostase e na deposição de matriz extracelular, e estudos têm tentado demonstrar o mecanismo molecular por trás deste antagonismo exercido pelas citocinas pró-inflamatórias. A indução diferencial de c-jun e JunB, fatores de transcrição da família do AP-1 que exibem atividade antagonista da transcrição, fundamenta a regulação diferencial do gene de expressão da MMP-1 pelo TGF- β e citocinas pró-inflamatórias, incluindo

TNF- α e IL-1. Outras vias de sinalização ativadas em resposta a vários estímulos fisiológicos ou ambientais, como, por exemplo, a luz UV, também têm sido demonstradas (76).

De modo geral, as MMPs participam da regeneração do tecido por serem capazes de degradar quase todos os tipos de proteínas da matriz extracelular. Por outro lado, TGF- β é uma citocina que funciona como um modulador crítico na biossíntese de componentes macromoleculares na matriz extracelular. O desequilíbrio entre eles é uma das causas direta do envelhecimento da pele (77), ao mesmo tempo que a compreensão e manipulação destes mecanismos moleculares podem ser utilizadas para o desvio deste equilíbrio em direção a um processo de rejuvenescimento.

Nas últimas décadas, com a destruição contínua da camada de ozônio na atmosfera, as pessoas estão cada vez mais expostas à radiação UV, uma das principais causas do envelhecimento extrínseco.

Além da regulação da expressão de MMPs, a exposição excessiva à radiação UV provoca um processo de inflamação agudo na pele, e prostaglandinas (PGs) e óxido nítrico desempenham uma função importante no processo inflamatório. UVB induz a produção de ciclooxigenase 2 (COX-2), que é a enzima responsável pela limitação na velocidade de reação de formação de PGs, além de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS promovem a ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAP quinase), que recruta c-fos e c-jun para o núcleo, ativa o NF-KB e regula o gene relacionado ao processo pró-inflamatório (78).

Uma vez que a atividade do sistema de defesa diminui com o envelhecimento, os níveis de ROS são gradualmente elevados e promovem a perda da homeostase da pele. A redução do estresse oxidativo pode contribuir efetivamente para a recuperação da homeostase da pele e, conseqüentemente, para a prevenção dos eventos que danificam fisicamente a estrutura da matriz dérmica. Sob estresse oxidativo, a elastase, enzima que hidrolisa a elastina na derme, é ativada, levando à perda da elasticidade dérmica. O envelhecimento da pele também é caracterizado pelo aumento anormal das ligações cruzadas entre as proteínas da matriz. A ligação cruzada entre as proteínas da matriz, como colágeno

e elastina é fundamental para manter a resistência da pele; no entanto, ligações inadequadas, que aparecem devido à presença de ROS, deterioram as propriedades mecânicas da pele (65).

Trabalhos recentes demonstraram que o aumento da expressão de MMP-1 dependente da idade também é ROS-dependente (figura 41).

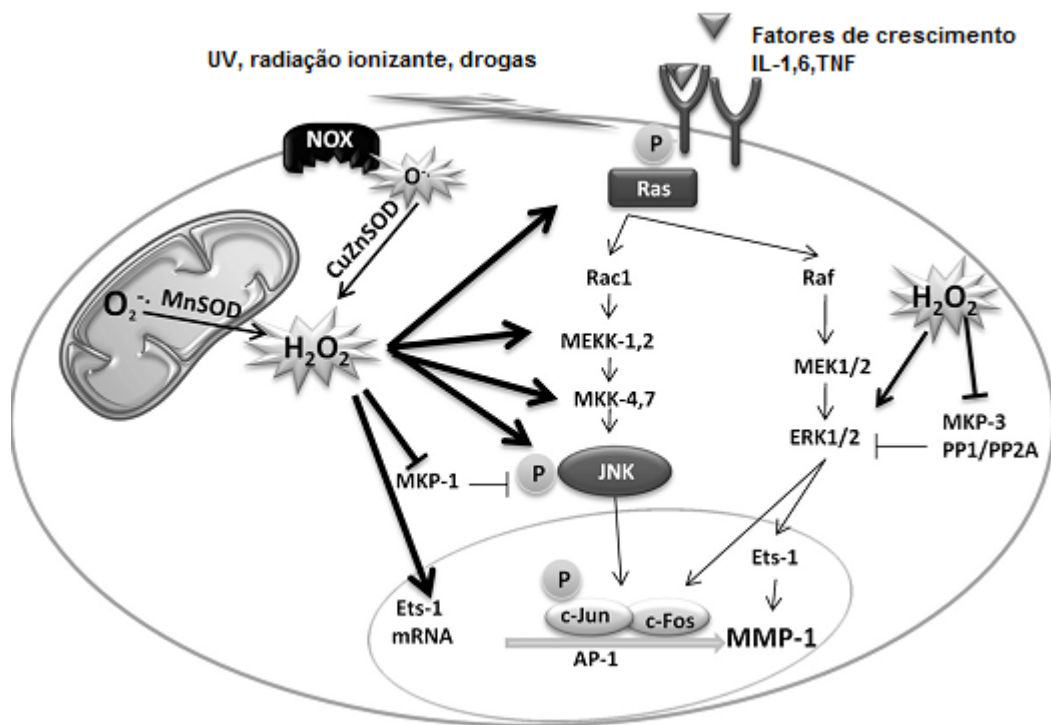


Figura 41. Modelo de indução redox-dependente de MMP-1 associado à senescência. Adaptado de Kar e colaboradores, 2010 (79)

Além disso, durante o envelhecimento, enquanto a expressão das metaloproteinases aumenta, o nível dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) diminui. Portanto, um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno resulta na redução da espessura dérmica (66).

A avaliação da expressão das metaloproteinases na pele dos camundongos, por meio de zimografia em gel de eletroforese contendo gelatina (tabela 5) mostrou que, nos machos, somente a pele dos animais idosos do grupo controle e dos animais adultos do grupo tratado com dispersão de *L*-arginina a 10%, apresentaram atividade proteolítica no gel. As bandas de proteína com atividade proteolítica

encontradas para as amostras dos animais idosos do grupo controle correspondiam a massas moleculares de 81 kDa, que pode ser correspondente à pró-MMP-8, 57 kDa, que sugere a presença de pró-MMP-2, 26 kDa e 16 kDa, que sugere a presença de pró-MMP-7 (metaloelastase) e MMP-7 ativa. No grupo de animais adultos, a banda encontrada correspondia a uma massa molecular de 28 kDa, possivelmente pró-MMP-7, figura 13.

Na tabela 6, que traz os resultados obtidos para os ensaios da avaliação de atividade proteolítica das amostras de pele dos camundongos fêmeas, pode-se observar que a atividade proteolítica para os animais deste gênero só foi encontrada nas amostras dos animais do grupo tratado com glicerina das idosas. As bandas de proteínas que mostraram atividade proteolítica correspondem a massas moleculares de 90 kDa, que sugere a expressão de pró-MMP-9, 29 kDa e 20 kDa, que sugere a expressão de pró-MMP-7 e MMP-7 ativa, respectivamente (figura 40). É importante observar que para o grupo de fêmeas idosas não foi possível realizar este ensaio para o grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento, tendo o grupo tratado com glicerol funcionado, assim, como o único grupo controle.

Em resumo, as amostras de pele do grupo de animais idosos, tanto de machos quanto de fêmeas, apresentaram proteínas com atividade proteolítica, de acordo com o esperado, já que no envelhecimento acontece um aumento da expressão das MMP. O mesmo grupo de animais idosos, ao receber o tratamento com dispersão de *L*-arginina não apresentou atividade proteolítica. Esses resultados sugerem que o tratamento com dispersões de *L*-arginina pode ter inibido, de alguma forma, a expressão das MMPs.

Um fato curioso de se observar é que, diferente do que aconteceu com a expressão de iNOS e a intensidade de coloração de colágeno nas lâminas histológicas das amostras de pele dos camundongos, que estavam correlacionadas, a atividade proteolítica das MMPs presentes nas amostras, e demonstradas na zimografia (figuras 39 e 40), não coincidiu com a expressão de iNOS nas amostras de pele. Estudos futuros, que incluam ensaios com mais especificidade para a análise da expressão das MMPs e de outras proteínas envolvidas neste processo, como a arginase e os TIMPs, devem ser conduzidos, além da avaliação de citocinas inflamatórias neste processo.

A rede de fibras elásticas ocupa cerca de 2 a 4%, em volume, da derme. Tem como principal função garantir resiliência e flexibilidade. As fibras elásticas são projetadas para manter a função elástica por um determinado tempo de vida e, dessa forma, sofrem alterações com o envelhecimento, especialmente entre os 30 e 70 anos de vida. No envelhecimento intrínseco, a fragmentação das fibras elásticas resulta na diminuição do número e no diâmetro das fibras. Com o aumento da idade observa-se uma diminuição da elasticidade fisiológica da pele (80).

Junto com essas mudanças, as células envelhecidas apresentam reduzida capacidade de ressintetizar as fibras elásticas degradadas naturalmente (8, 27). Diante disso, foi avaliada a influência da *L*-arginina nas fibras elásticas da pele dos camundongos. Os cortes histológicos foram preparados e a coloração utilizada para a evidência das fibras elásticas foi a de Verhoeff. Como os cortes foram corados em dois blocos, algumas lâminas apresentaram um fundo que dificultou a contagem das fibras elásticas e, por este motivo, futuramente novos análises deverão ser feitas para esclarecer alguns resultados.

Comparando somente o grupo controle (CTRL) dos idosos machos e fêmeas, não houve diferença significativa na quantidade de fibras elásticas entre os grupos. No entanto, os grupos CTRL dos animais adultos e jovens fêmeas apresentaram maior quantidade de fibras elásticas que os machos na mesma faixa etária. Além disso, as fêmeas apresentaram uma diminuição significativa na quantidade de fibras elásticas com o envelhecimento, já os machos mantiveram uma certa homogeneidade na quantidade das fibras nas diferentes faixas etárias. Essa diminuição das fibras elásticas proeminente nas fêmeas pode ser explicada pela deficiência característica de estrogênio na fase final da idade fértil.

Entre os animais machos do grupo idoso não houve nenhuma diferença significativa entre o grupo CTRL e os grupos tratados. Já os animais fêmeas do grupo de idosos apresentaram uma maior quantidade de fibras elásticas na pele com o tratamento de dispersão de *L*-arginina a 15%. No grupo de animais jovem, tanto de fêmeas quanto de machos, não houve diferença no número de fibras elásticas da pele com o tratamento tópico de *L*-arginina. Esses resultados sugerem que a *L*-arginina pode contribuir de alguma forma para o aumento de fibras elásticas na pele em camundongos idosos.

A pele tem como principal função a proteção do organismo contra agentes químicos, físicos e biológicos. Funciona como uma eficiente barreira contra penetração e permeação de substâncias exógenas. No entanto, o que representa uma proteção para o ser humano é um empecilho para a ação terapêutica e cosmética de substâncias farmacêuticas aplicadas topicamente (53).

Dessa forma, a eficácia de uma substância farmacêutica aplicada por via tópica depende, não somente de suas propriedades farmacológicas, mas também da sua biodisponibilidade no local de ação (81). A permeação de um fármaco na pele depende, principalmente, das suas propriedades físico-químicas, do comportamento do fármaco na formulação farmacêutica e de seu comportamento no organismo (82).

Vários fatores podem afetar a absorção do fármaco na pele, como a espessura da pele, o grau de hidratação, o fluxo sanguíneo, o número de folículos pilosos, a concentração de lipídeos, o pH da superfície da pele, a integridade do estrato córneo, dentre outras. O estrato córneo, camada de células mortas e queratinizadas, é considerado a principal barreira à permeação dos fármacos na pele. Outro aspecto de extrema importância é o fluxo transdérmico, que é fortemente influenciado pelo coeficiente de partição da substância, ou seja, pelas suas características de hidrofília ou lipofília (82).

O coeficiente de partição óleo/água da *L*-arginina foi determinado usando o sistema de partição octanol/água. O valor encontrado para $K_{O/A}$ foi de $0,147 \pm 0,028$ e para o $\text{Log } K_{O/A}$ foi de $-0,83699 \pm 0,089467$. Esses valores indicam o caráter hidrofílico deste aminoácido.

A *L*-arginina também foi submetida ao teste de retenção, penetração e permeação cutânea, usando como modelo a pele de orelha suína. A pele de orelhas suínas foi utilizada por apresentar propriedades histológicas e bioquímicas semelhantes à pele humana. É considerado o modelo animal mais relevante em substituição à pele humana. Vários estudos demonstram similaridade de permeabilidade a fármacos, entre a pele humana e a pele suína, sendo a pele de orelhas de suínos aplicáveis a estudos *in vitro* (83).

Avaliando a concentração de *L*-arginina que ficou retida no EC, que penetrou a pele e que a permeou, para cada concentração de dispersão de *L*-arginina

aplicada, não houve diferença significativa de comportamento entre as dispersões com concentrações de 5% e 15%. No entanto, para a concentração de 10%, a quantidade de *L*-arginina que ficou retida no estrato córneo foi maior que a quantidade de aminoácido que conseguiu permear através da pele. Mas o importante é que a *L*-arginina apresentou o mesmo perfil de penetração para as diferentes concentrações.

6. CONCLUSÕES.

- O tratamento tópico com *L*-arginina melhorou a resistência da pele dos camundongos à força de tração para os animais do grupo de fêmeas e machos idosos.
- A pele dos animais machos idosos apresentou mais fibras colágenas que a das fêmeas idosas.
- A perda de fibras elásticas na pele dos camundongos com o envelhecimento foi mais proeminente nas fêmeas que nos machos.
- O tratamento tópico com dispersão de *L*-arginina na concentração de 15% nas fêmeas idosas promoveu a formação de maior quantidade de fibras colágenas e elásticas na pele dos camundongos.
- No grupo dos machos idosos, adultos e jovens e das fêmeas jovens houve uma correlação inversa entre a expressão de iNOS e a quantidade de fibras colágenas na pele.
- Nos grupos dos animais idosos, machos ou fêmeas, o tratamento com *L*-arginina diminuiu a atividade proteolítica das MMPs na pele.
- A *L*-arginina apresentou um caráter hidrofílico e, para todas as concentrações estudadas, mostrou um perfil de retenção, penetração e permeação cutânea similar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Harris, M. I. N. C. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento; colaboração Maria Edwiges Hoffmann e Adriane Curvinel. São Paulo: editora Senac, São Paulo, 2003.
2. Guéniche, A.; Philippe, D.; Bastien, P.; Blum, S.; Buyukpamukcu, E.; Castiel-Higounend, I. Probiotics of photoprotection. *Dermato-Endocrinology*. 1(5): 275-279, 2009.
3. Maciel, D.; Oliveira, G.G.; Prevenção do envelhecimento cutâneo e atenuação de linhas de expressão pelo aumento da síntese de colágeno, 2011.
4. Naylor, E.C.; Watson, R.E.B.; Sherratt, M.J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69: 249– 256, 2011.
5. Fisher, G.J., PhD; Kang, S., MD; Varani, J., PhD; Csorgo, Z. B., MD; Wan, Y., PhD; Datta, S., PhD; Voorhees, J.J., MD. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch Dermatol*,138:1462-1470, 2002.
6. Paeon, H; Bakala, H.; Monnier, V.M.; Asselineau, D. Collagen glycation triggers the formation of aged skin *in vitro*. *Eur J Dermatol*, 17 (1): 12-20, 2007.
7. Hwang, K.A.; Yi, B.R.; Choi, K.C. Molecular Mechanisms and In Vivo Mouse Models of Skin Aging Associated with Dermal Matrix Alterations. *Laboratory animal research*, 27(1): 1-8, 2011.
8. Jenkins, G. Molecular mechanisms of skin ageing, *Mech. Ageing Dev.* 123: 801–810, 2002.
9. Baumann, L. Skin ageing and its treatment. Department of Dermatology, University of Miami, Miami Beach, FL, USA. 2007.
10. Ivic, N.P. Skin aging. *Acta Dermatoven APA*, 17 (2): 47-54, 2008.
11. Farage, M.A.; Miller, K.W.; Elsne, P.; Maibach, H.I. Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 30: 87– 95, 2008.
12. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological,

immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol*: 11: 398–405, 2002.

13. Oriá, R.B., Ferreira, F.V.A., Santana, E.N., Fernandes, M.R., Brito, G.A.C. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histo-morfometria e autofluorescência. *Anais brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, 78(4):425-434, jul./ago. 2003.

14. Langton, A.K.; Sherratt, M.J.; Griffiths, C.E.M.; Watson, R.E.B. A new wrinkle on old skin: the role of elastic fibres in skin ageing. *International Journal of Cosmetic Science*, 32: 330–339, 2010.

15. Patino, M.G.; Neiders, M.E.; Andreana, S.; Noble, B.; Cohen, R.E. Collagen: an overview. *Implant Dent.*, 11(3):280-5, 2002.

16. Quan, T.; Qin, Z.; Xia, W.; Shao, Y.; Voorhees, J.J.; Fisher, G.J. Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 14: 20–24, 2009.

17. Kadler, K.E.; Baldock, C.; Bella, J.; Boot-Handford, R.P. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science* 120: 1955-1958, 2007.

18. Shoulders, M.D.; Raines, R.T. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem*, 78: 929–958, 2009.

19. Ortega. Y.V., Tomey, A.V. Metaloproteinasas de la matríz e envejecimiento cutáneo. Calle 17 núm. 19402 e/ 194 e 198. Reparto Siboney. 2003.

20. Fisher, G.J.; Quan, T.; Purohit, T.; Shao, Y.; Cho, M.K.; He, T.; Varani, J.; Kang, S.; Voorhees, J.J. Collagen Fragmentation Promotes Oxidative Stress and Elevates Matrix Metalloproteinase-1 in Fibroblasts in Aged Human Skin. *The American Journal of Pathology*, 174 (1): 101-114, 2009.

21. Mine, S.; Fortunel, N.O.; Pigeon, H.; Asselineau, D.; Aging Alters Functionally Human Dermal Papillary Fibroblasts but Not Reticular Fibroblasts: A New View of Skin Morphogenesis and Aging. *Plos One*, 3 (12), 2008.

22. Valenti, D.M.Z.; Silva, J.; Teodoro, W.R.; Velosa, A.P.; Mello, S.B.V. Effect of topical clay application on the synthesis of collagen in skin: an experimental study. *Clinical and Experimental Dermatology*, 37: 164-168, 2011.

23. Helfrich, Y.R.; Sachs, D.L.; Voorhees, J.J. Overview of Skin Aging and Photoaging. *Dermatology nursing*, 20 (3): 177-183, 2008.

24. Contet-Audonneau, J.L.; Jeanmaire, C.; Pauly, G. A histological study of human wrinkle structures: comparison between sunexposed areas of the face, with or without wrinkles, and sunprotected areas. *Br J Dermatol*, 140(6):1038–1047, 1999.
25. Craven, N.M.; Watson, R.E.; Jones, C.J.; Shuttleworth, C.A.; Kielty, C.M.; Griffiths, C.E. Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br J Dermatol*, 137(3):344–350, 1997.
26. Sherratt, M.J. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *AGE* 31:305–325, 2009.
27. Uitto, J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *Journal of drugs in dermatology*, Philadelphia, 7(2) Supplement. 2008.
28. Kielty, M.C.; Sherratt, M.J.; Shuttleworth, A. Elastic fibres. *Journal of Cell Science*, 115: 2817-2828, 2002.
29. Seite, S., Zucchi, H., Septier, D., Igondjo-Tchen, S., Senni, K., Godeau, G. Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *Journal compilation JEADV*, France, 20: 980-987, 2006.
30. Rydlova, M.; Houlubec Jr., L.; Ludvikova Jr., M.; Kalfert, D.; Franekova, J.; Povysil, C.; Ludvikova, M. Biological Activity and Clinical Implications of the Matrix Metalloproteinases. *Anticancer research*, 28: 1389-1398, 2008.
31. Gill, S.E.; Parks, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of Wound healing. *Int. J Biochem Cell Biol.* 2008; 40 (6-7): 1334-1347.
32. Hornebeck, W. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathologie Biologie*, 51: 569–573, 2003.
33. Lindner, D.; Zietsch, C.; Becher, P.M.; Schulze, K.; Schultheiss, H.P.; Tschöpe, C.; Westermann, D. Differential Expression of MatrixMetalloproteases in Human Fibroblasts with Different Origins. *Biochemistry Research International*, 1-10, 2012.
34. Schellini, S.A.; Hoyama, E.; Oliveira, D.E.; Bacchi, C.D.; Padovani, C.R. Matrix metalloproteinase-9 expression in pterygium. *Arq Bras Oftalmol.*, 69(2):161-4, 2006.
35. Kyriakides, T.R.; Wulsin, D.; Skokos, E. A.; Fleckman, P.; Pirrone, A.; Shipley, J.M.; Senior, R.M.; Bornstein, P. Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display

delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis. *Matrix Biology*, 28 (2), 65-73, 2009.

36. Shi, H.P.; Most, D., Efron, D.T.; Witte, M.B.; Barbul, A. Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats. *Wound Repair and Regeneration*, 11(3): 198-203, 2003.

37. Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a5006?lang=pt®ion=BR>.

Acesso: 23 jun.2012.

38. Popovic, P.J.; Zeh III, H.J.; Ochoa, J.B. Arginine and Immunity. *The Journal of Nutrition*, 137: 1681S–1686S, 2007.

39. Barbul, A. Proline Precursors to Sustain Mammalian Collagen Synthesis. *The Journal of Nutrition*, 138: 2021S–2024S, 2008.

40. Soneja, A.; Drews, M.; Malinski, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological reports*, 57: 108-119, 2005.

41. Filho, R.F.; Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. *Rev Ass Med Brasil*, 46(3): 265-71, 2000.

42. Mori, M. Regulation of Nitric Oxide Synthesis and Apoptosis by Arginase and Arginine Recycling. *The Journal of Nutrition*, 137: 1616S–1620S, 2007.

43. Hsu, H.C.; Hsiao, M.; Wang, L.F.; Chien, Y.W.; Lee, W.R. Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation. *Nitric Oxide*, 14 :327–334, 2006.

44. Xia, W.; Szomor, Z.; Wang, Y.; Murrell, G.A. Nitric oxide enhances collagen synthesis in cultured human tendon cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 24(2):159-72, 2006.

45. Chu, A.J.; Prasad, J.K. Up-regulation by human recombinant transforming growth factor b-1 of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling. *Nitric Oxide and Collagen Production*, 188(3): 271-280, 1999.

46. Bellon, G.; Monboisse, J.C.; Randoux, A.; Borel, J.P. Effects of preformed proline and proline amino acid precursors (including glutamine) on collagen synthesis in human fibroblast cultures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 930: 39-47, 1987.

47. Albina, J.E.; Abate, J.A.; Mastrofrancesco, B. Role of ornithine as a proline precursor in healing wounds. *Journal of surgical research*, 55 :97-102, 1993.
48. Herkenne, C.; Alberti, I.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Mathy, F.X.; Pr eat, V.; Guy, R.H. In Vivo Methods for the Assessment of Topical Drug Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 25 (1), 87-103, 2008.
49. Dhamecha, D.L.; Rathi, A.A., Saifee, M.; Lahoti, S.R.; Dehghan, M.H.G. Drug vehicle based approaches of penetration enhancement. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1): 24-46, 2009.
50. Praça, F.S.G. Libera o e permea o *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condi es experimentais. Tese (Doutorado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
51. Kumar, R.; Philip, A. Modified Transdermal Technologies: Breaking the Barriers of Drug Permeation via the Skin. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 6 (1): 633-644, 2007.
52. Pittermann, W. In-vitro skin and mucous membrane tests in the focus of cosmetics research. Disponível em: http://www.gd-online.de/german/originals_d/Pittermann2000.html. Acesso em: 23 jun.2012.
53. Baby, A.L.; Filho, C.A.H.; Sarruf, F.D.; J nior, C.R.T.; Pinto, C.A.S.O.; Zague, V.; Ar as, E.P.G.; Kaneko, T.M.; Velasco, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetra o cut nea *in vitro* da rotina veiculada em uma emuls o cosm tica através de um modelo de biomembrana alternativo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44 (2): 233-248, 2008.
54. Scale-Up and Postapproval Changes:Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1997.
55. Hotchkiss, R.D. A microchemical reaction resulting in the standing of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch Bioch* 1948; 16: 131.
56. Verhoeff, F.H.: *Amer. Med Ass.*: 50, 876-1908.
57. Wells, J.I. *Pharmaceutical Preformulation – the physicochemical properties of drug substances*. [S.I.]: Ellis Horwood, p.21-85, 1988.

58. Moore, S. Amino acid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 243: 6281–6283, 1968.
59. Bemvindo, C.S. Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 110 p., 2006.
60. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L & Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951
61. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* 227, 680-685, 1970.
62. Montagner, S.; Costa, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. *An Bras Dermatol.*, 84(3):263-9, 2009.
63. Son, E.D.; Lee, J.Y.; Lee, S.; Kim, M.S.; Lee, B.G.; Chang, I.S.; Chung, J.H. Topical Application of 17 β -Estradiol Increases Extracellular Matrix Protein Synthesis by Stimulating TGF- β Signaling in Aged Human Skin In Vivo. *J Invest Dermatol* 124:1149 –1161, 2005.
64. Bagatin, E. Mecanismos do envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmeceuticos. *Revista Brasileira de medicina*, 66 (3): 5-11, 2009.
65. Hwang, H.J. Skin Elasticity and Sea Polyphenols. *Seanol Science Center Review*, 1(1), 1-10, 2010.
66. Landau, M. Current problems in dermatology. Exogenous factors in skin aging, 35: 1-13, 2007.
67. Choe, T.; Lee, B.; Park, I.; Hong, S. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 and -2 expression using nitric oxide synthase inhibitors in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *J. Cosmet. Sci.*, 54: 229-238, 2003.
68. Zhang, M.; Dang, L.; Guo, F.; Wang, X.; Zhao, W.; Zhao, R. Coenzyme Q10 enhances dermal elastin expression, inhibits IL-1 α production and melanin synthesis in vitro. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 273–279, 2012.
69. Agius, J.C.; Baron, Y.M.; Brincat, M.P. Skin ageing. *Menopause International*, 13: 60–64, 2007.

70. Levakov, A.; Vuckovic, N.; Dolai, M.; Mocko Kacanski, M.; Bozanic, S. Age-related skin changes. *Med Pregl*, LXV (5-6): 191-195, 2012.
71. Hara, M.; Verkman, A.S. Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice. *PNAS*, 100 (12): 7360-7365, 2003.
72. Calleja-Agius, J.; Brincat, M.P. Effects of hormone replacement therapy on connective tissue: why is this important? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 23: 121–127, 2009.
73. Brincat, M.P.; Calleja-Agius, J. Menopause and ageing of the skin and mucosae: Impact on quality of life. 6th IMS workshop, Menopause and ageing, quality of life and sexuality, 2006.
74. Lin, S.K.; Kok, S.H.; Kuo, M.Y.P.; Lee, M.S.; Wang, C.C.; Lan, W.H.; Hsiao, M.; Goldring, S.R.; Hong, C.Y. Nitric Oxide Promotes Infectious Bone Resorption by Enhancing Cytokine-Stimulated Interstitial Collagenase Synthesis in Osteoblasts. *Journal of bone and mineral research*, 18 (1): 39-46, 2003.
75. Durante, W.; Jonhson, F.K.; Jonhson, R.A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34, 906–911, 2007.
76. Verrecchia, F.; Mauviel, A. TGF- β and TNF- α : antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cellular Signalling* 16: 873 – 880, 2004.
77. Huang, J.; Luo, X.; Lu, J.; Chen, J.; Zuo, C.; Xiang, Y.; Yang, S.; Tan, L.; Kang, J.; Bi, Z. IPL irradiation rejuvenates skin collagen via the bidirectional regulation of MMP-1 and TGF- β 1 mediated by MAPKs in fibroblasts. *Lasers Med Sci*, 26:381–387, 2011.
78. Wen, K.C.; Fan, P.C.; Tsai, S.Y.; Shih, I.C.; Chiang, H.M. *Ixora parviflora* Protects against UVB-Induced Photoaging by Inhibiting the Expression of MMPs, MAP Kinases, and COX-2 and by Promoting Type I Procollagen Synthesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 11 pages, 2012.
79. Kar, S.; Subbaram, S.; Carrico, P.M.; Melendez, J.A. Redox-control of matrix metalloproteinase-1: A critical link between free radicals, matrix remodeling and degenerative disease. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 174:99–306, 2010.

80. Waller, J.M.; Maibach, H.I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Research and Technology*; 12: 145-154, 2006.
81. Martins, M.R.F.M.; Veiga, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 38 (1): 33-54, 2002.
82. Silva, J.A.; Apolinário, A.C.; Souza, M.S.R.; Damasceno, B.P.G.L.; Medeiros, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada*, 31(3):125-131, 2010.
83. Chávez, J.J.E.; Sanjuán, V.M.; Cervantes, M.L.; Morlan, Z.U.; Segundo, E.P.; Guerrero, D.Q.; Quintanar, A.G. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. *J Pharm Pharmaceut Sci.*, 11 (1): 104-130, 2008.

ANEXO I



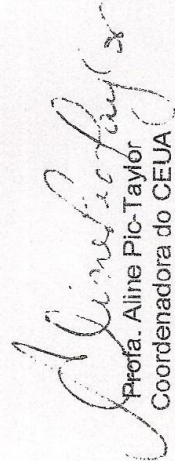
Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 7 de outubro de 2011.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VIVO DA L-ARGININA NA ELASTICIDADE DA PELE."**, UnBDOC n.º 47217/2009, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria de Fátima Borin, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Profa. Aline Pic-Taylor
Coordenadora do CEUA



